

**ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON
ZWEI HEXOKINASEN UNTERSCHIEDLICHER
SPEZIFITÄT AUS DEM FLUSSKREBS
ORCONECTES LIMOSUS (RAFINESQUE)**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Sabine Wolter

aus Düsseldorf

1967

**ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON
ZWEI HEXOKINASEN UNTERSCHIEDLICHER
SPEZIFITÄT AUS DEM FLUSSKREBS
ORCONECTES LIMOSUS (RAFINESQUE)**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Sabine Wolter

aus Düsseldorf

1. Referent Prof. Dr. K. Urich

2. Referent Prof. Dr. K. Günther

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Dezember 1966

Tag der Promotion: 13. Juli 1967

Die vorliegende Arbeit entstand am II. Zoologischen Institut der Freien Universität Berlin auf Anregung von Herrn Prof. Dr. K. Urich. Für die Überlassung eines Arbeitsplatzes und für die stete Beratung und großzügige Förderung der Arbeit bin ich Herrn Prof. Dr. Urich zu größtem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. J.G. Moser vom II. Zoologischen Institut danke ich für manchen Ratschlag zur Methodik.

Bei der Ausführung der Arbeit wurden Leihgaben der Deutschen Forschungsgemeinschaft an Herrn Prof. Dr. Urich benutzt.



Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
1. Überblick über die Enzymgruppe der Hexo- kinasen	1
2. Aufgabenstellung	3
Material und Methoden	0
1. Tiermaterial	10
2. Präparation und Aufarbeitung	10
3. Aktivitätsbestimmungen	11
a) Bestimmung über den Zuckerverbrauch im Ansatz	11
b) Bestimmungen im optischen Test	15
4. Proteinbestimmung	17
5. Verfahren zur Reinigung und Trennung der Hexokinaseaktivität	18
a) Ammoniumsulfat-Fällung	18
b) Chromatographie an Ionenaustauschern	18
c) Gelfiltration	21
d) Gel-Elektrophorese	21
6. Identifizierung der Endprodukte der Phosphorylierung	25
7. Fehlerangaben, Statistik	26
Ergebnisse	27
1. Bestimmungen am Rohextrakt	27
a) pH-Aktivitätskurve	27
b) Verteilung des Enzyms in der Zelle ..	27
c) Einfluß des Geschlechtes auf die En- zymaktivität	28
d) Stabilität der Enzymaktivität	29
e) Aktivität des Rohextraktes gegenüber sechs Zuckern	33
2. Fraktionierung	35
a) Ammoniumsulfat-Fällung	35
b) Säulenchromatographie	36
c) Elektrophorese	41

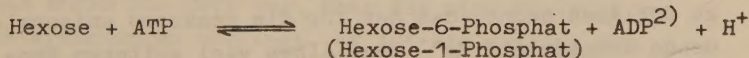
	Seite
3. Charakterisierung der beiden Enzym- aktivitäten	48
a) Spezifität	48
b) Endprodukte der Phosphorylierung ...	48
c) Bestimmung der Michaeliskonstanten .	48
Diskussion und vergleichende Betrachtung ...	54
Zusammenfassung	64
Literaturverzeichnis	66

E i n l e i t u n g

1. Überblick über die Enzymgruppe der Hexokinasen.

Die Wirkung der Hexokinase wurde 1927 von MEYERHOF entdeckt, der zeigen konnte, daß der Umsatz der freien Hexosen im Extrakt von Kaninchen- und Froschmuskeln durch Zusatz einer Alkoholfällung aus Hefautolysat sehr gesteigert wurde. Er stellte fest, daß dieser "Aktivator" aus Hefe zur vollen Wirkung ATP¹⁾ und Mg⁺⁺ benötigte und offensichtlich die freien Zucker zu Hexosephosphat veresterte (MEYERHOF 1932). V.EULER und ADLER untersuchten 1935 dieses System ebenfalls und benannten das Enzym, das die Phosphatübertragung von ATP auf Hexosen katalysiert, "Heterophosphatase". MEYERHOF gab ihm dann seinen heutigen Namen Hexokinase (MEYERHOF 1935).

Spätere Untersuchungen zeigten, daß diese Enzyme, die den ersten Schritt im Stoffwechsel der freien Zucker katalysieren, wohl in allen Zellen vorkommen, die Hexosen oder Pentosen umsetzen können. Die Hexokinasen übertragen den terminalen energiereichen Phosphatrest des ATP im allgemeinen auf die primäre OH-Gruppe einer Hexose. Bei Aldosen wird also am C-6 phosphoryliert, bei Ketosen am C-1 oder C-6. Eine Phosphorylierung am Halbacetal von Aldosen erfolgt selten (siehe Galaktokinase S.7). Die Hexokinasen katalysieren also die Reaktion



Die Reaktion verläuft bevorzugt nach rechts. In der gleichen Art können auch freie Pentosen wie Ribose, Ribulose und Xylulose in den Stoffwechsel eingeschleust werden. Die Enzyme, die nur Pentosen angreifen, werden als Pentokinasen zusammengefaßt (CRANE 1962). Sie sind hauptsächlich bei Bakterien beschrieben worden (HOCHSTER u. WATSON 1952; HOCHSTER 1954-55; LONG 1955;

1) Adenosintriphosphat

2) Adenosindiphosphat

STUMPF u. HORECKER 1956; SIMPSON u. WOOD 1956, 1958; KLINE u. BARON 1957; BURMA u. HORECKER 1957, 1958). Man findet sie auch in Hefe (SABLE 1952, 1955) und Säugerleber (AGRANOFF u. BRADY 1956; HICKMAN u. ASHWELL 1958).

In den folgenden Ausführungen wird auf die Pentokinasen nicht weiter eingegangen, sondern es sollen nur einige Enzyme betrachtet werden, die Hexosen und ihre Derivate phosphorylieren. Aus der hierzu vorliegenden, sehr umfangreichen Literatur wurde eine Auswahl mit dem Ziel getroffen, die Eigenschaften dieser überall verbreiteten Enzyme kurz zu erörtern.

Wie schon MEYERHOF fand, werden zum Ablauf der Phosphorylierung außer den beiden Substraten ATP und Hexose noch katalytische Mengen von Mg^{++} -Ionen benötigt. Da in vielen Fällen in vitro die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird, wenn das Verhältnis der Konzentrationen $ATP/Mg^{++} = 1$ ist, nimmt WALAAS an, daß zuerst ein ATP-Mg-Komplex gebildet wird, bevor die Bindung an das Enzym erfolgt (WALAAS u. WALAAS 1962). Die Wirkung der Mg^{++} -Ionen kann in manchen Fällen durch andere zweiwertige Ionen wie Mn^{++} , Co^{++} , Ni^{++} ersetzt werden (HOARE u. KERLY 1954; SHEMAKOVA u. BLAGOVESHCHENSKY 1956; BRINTZINGER u.a. 1959; WALAAS u. WALAAS 1962; DI PIETRO 1963; ZEWE u.a. 1964). Magnesium nimmt aber eine klare Sonderstellung ein, die BRINTZINGER mit der Theorie zu erklären sucht, daß der für die Reaktion entscheidende Komplex mit Mg^{++} über einen viel weiteren Konzentrationsbereich beständig ist als mit anderen Metallionen. Einen besonderen Fall in bezug auf die Aktivierung durch zweiwertige Ionen stellt die Hexokinase des Schlauchpilzes Neurospora crassa dar (MEDINA u. NICHOLAS 1957), die zur maximalen Aktivität Zn^{++} benötigt.

Als Phosphatdonator dient fast ausschließlich ATP. In einigen Untersuchungen wurde gefunden, daß Inosin-

triphosphat ATP bis zu einem gewissen Grad ersetzen kann (MARTINEZ 1961; SEED u. BAQUERA 1965). Eine einmalige Besonderheit in Hinblick auf den Phosphatdonator zeigt die Hexokinase einiger Mykobakterienstämme. Hier wird die höchste Enzymaktivität erreicht, wenn statt ATP anorganische Polyphosphate eingesetzt werden (SZYMONA u.a. 1962, 1964).

Die meisten Hexokinasen werden durch ihre Reaktionsprodukte ADP kompetitiv und Glucose-6-Phosphat (G-6-P) nichtkompetitiv gehemmt. Diese nichtkompetitive Hemmung durch G-6-P stellt einen Kontrollmechanismus für den Glucoseverbrauch in der lebenden Zelle dar (REGEN u.a. 1964; ROSE u. O'CONNELL 1964).

Wie schon erwähnt, stellte man Hexokinaseaktivitäten in einer Vielzahl von Organismen fest, und man kann annehmen, daß diese Enzyme allgemein verbreitet sind. Eine tabellarische Zusammenfassung bekannter Hexokinasen findet man bei CRANE (1962). Auf Grund ihrer Fähigkeit, entweder mehrere oder bevorzugt einen Zucker umzusetzen, kann eine grobe Einteilung in unspezifische und spezifische Hexokinasen getroffen werden. Eine Zuordnung ist zum Teil schwer durchzuführen, da nur die wenigsten der untersuchten Enzyme hochgereinigt werden konnten und nur in wenigen Fällen eine große Anzahl von Zuckern als Substrate getestet wurde.

Den Prototyp der unspezifischen Hexokinase stellt das Enzym aus Hefe dar, über das eine Vielzahl von Untersuchungen vorliegt. Es ist die einzige kristallisierte Hexokinase (BERGER u.a. 1946; KUNITZ u. MCDONALD 1946; BAILY u. WEBB 1948) und stellt ein Protein vom Albumintyp dar mit einem Molekulargewicht von 96 000 (MCDONALD 1955). Eine aktivere Präparation wurde durch Chromatographie von kristallisiertem Enzym an Ionenaustauschern (CM- und DEAE-Cellulose)¹⁾ erhalten. Molekulargewichtsbestimmungen an dieser Präparation ergaben den Wert 50 000 (AGREN u.a. 1960, 1963). In ihrer Substratspezifität wurde

¹⁾ Carboxymethyl- und Diäthylaminoäthyl-Cellulose

die Hefehexokinase eingehend von SOLS und Mitarb. untersucht, die eine große Anzahl von Hexosen und ihren Derivaten testeten und neun von ihnen als Substrate identifizieren konnten (SOLS u.a. 1958). Die Hauptsubstrate sind Glucose, Fructose, Mannose, 2-Desoxyglucose und Glucosamin. Die Zucker werden in C-6-Stellung phosphoryliert. Dies gilt auch für die anderen unspezifischen Hexokinasen.

Den gleichen Typ, wenn auch mit geringfügigen Abweichungen in den Eigenschaften des Enzyms, findet man in den Organen der Säugetiere (Maus, Ratte, Meer-schweinchen, Kaninchen, Schaf, Rind u.a.). Besonders gut charakterisiert ist die gereinigte Hexokinase des Gehirns (SOLS u. CRANE 1954). Sie zeigt im gro-ßen und ganzen die gleiche Substratspezifität wie die Hefehexokinase. Es wurden 35 Zucker getestet, von denen 16 als Substrate dienen. Eine Besonderheit der Gehirnhexokinase ist, daß sie partikulär gebun-den ist und mit der Mitochondrienfraktion sedimentiert werden kann (CRANE u. SOLS 1953; JOHNSON 1960). Hexo-kinaseaktivitäten, die teilweise oder vollständig an Partikelfractionen gebunden sind, findet man auch in einigen anderen Organen von Säugetieren (CRANE u. SOLS 1953, 1955; MAYER u. MAYFIELD 1963), in Tumoren (MCCOMB u. YUSHOK 1959; BLECHER 1963; SYDOW 1963), bei dem Blutparasiten Spirochaeta recurrentis (SMITH 1960) und bei höheren Pflanzen (SALTMAN 1953). Die meisten Hexokinasen sind allerdings cytoplasmatisch. Man kann heute auch die Gehirnhexokinase in die lösliche Form überführen, ohne daß sie ihre Aktivität verliert (MOORE u. STRECKER 1963; JAGANNATHAN 1963).

KERLY u. LEABACK untersuchten 1957 das Gehirn von Vögeln (Columba, Gallus), Amphibien (Rana temporaria), Teleostiern (Seophthalmus maximus, Gadus merangulus), Elasmobranchiern (Scyllium canicula, Raia brachyura) und einem Cephalopoden (Sepia officinalis) auf Hexo-kinaseaktivität. Sie fanden, daß die Gehirnhexokinase

dieser Tiere in den Eigenschaften und in ihrer Verteilung in der Zelle völlig dem Enzym aus Säugerhirn entspricht.

Für die sog. Wirbellosen liegen nur vereinzelte Untersuchungen vor, die unspezifische Hexokinasen beschreiben; z.B. die Arbeiten über die Hexokinaseaktivität des Muskels der Wanderheuschrecke Locusta migratoria (KERLY u. LEABACK 1957) und des Erregers der Schlafkrankheit Leishmania donovani (CHATTERJEE u.a. 1958). Diese Enzymaktivitäten sind fast ausschließlich im Rohextrakt nachgewiesen worden, da die Enzyme sehr instabil sind und bei dem Versuch einer Reinigung inaktiviert werden. Es wurden auch nur die Hauptsubstrate getestet; aber aus dem Hemmverhalten und anderen Eigenschaften schließen die Autoren auf unspezifische Enzyme.

Neben der unspezifischen Hexokinase findet man in einigen Organen der Säugetiere Enzyme, die in vivo spezifisch für ein Substrat sind. VESTLING u. Mitarb. stellten 1950 fest, daß die Fructosephosphorylierung in Leberschnitten und -homogenaten der Ratte und anderer Säugetiere rascher verläuft als der Glucoseumsatz. Zwei Jahre später gelang es HERS (1952), ein Enzym aus Rinderleber anzureichern, das Fructose und Sorbose phosphoryliert. Aldosen werden nicht umgesetzt. Das Reaktionsprodukt ist Fructose-1-Phosphat (F-1-P) bzw. Sorbose-1-Phosphat. Zur maximalen Aktivität benötigt das Enzym eine hohe K^+ -Ionenkonzentration, nämlich 1 M. HERS erklärt die Wirkung der K^+ -Ionen dadurch, daß sie die Affinität des Enzyms für den Mg-ATP-Komplex erhöhen sollen (HERS 1952). Dasselbe Enzym wurde 1957 von PARKS und Mitarb. isoliert. Als weiteres Substrat der Fructo-1-Kinase wurde Tagatose festgestellt (HERS 1955). Im Stoffwechsel der Leber ist wohl die Fructose das einzig wichtige Substrat; mit diesem Zucker zeigt das Enzym auch seine höchste Aktivität. Die Bedeutung eines besonderen Enzyms

für die Fructosephosphorylierung ist folgende: Die Phosphorylierung der Fructose durch die unspezifische Hexokinase wird durch hohe Glucosekonzentration gehemmt. Da der Glucosegehalt der Leber dem des Blutes entspricht, würde die Fructose durch das unspezifische Enzym nicht umgesetzt werden. Die Fructo-1-Kinase dagegen, deren Aktivität durch Glucose nicht hemmbar ist, ermöglicht somit einen vom Glucosestoffwechsel unabhängigen Umsatz der Fructose. Durch anschließende Reaktionen wird das gebildete F-1-P in F-6-P umgewandelt und kann dann weiter umgesetzt werden (CORI u.a. 1951).

Ähnliche Enzyme wie die Fructo-1-Kinase der Leber wurden in der Mucosa (CADENAS u. SOLS 1960) und im Fettgewebe (GROMOVA 1963) gefunden. Es bestehen auch Hinweise, daß der Muskel ein solches Enzym besitzt (SLEIN u.a. 1950; HERS 1955). GINSBURG u. HERS (1960) nehmen an, daß die Umwandlung von Fructose in Glucose während der Passage durch den Darm des Meerschweinchens ebenfalls durch die Wirkung der Fructo-1-Kinase eingeleitet wird.

Aus den letzten Jahren liegen eine Anzahl von Untersuchungen über ein Enzym der Leber vor, das Glucose in C-6-Stellung phosphoryliert, aber nicht mit der unspezifischen Hexokinase der Leber identisch ist. Dieses Enzym hat eine sehr geringe Affinität für Glucose. Seine Michaeliskonstante, die die Substratkonzentration angibt, bei der halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit herrscht, beträgt $6 \cdot 10^{-3}$ bis $4 \cdot 10^{-2}$ M (DI PIETRO u.a. 1962; VINUELA u.a. 1963; WALKER 1963), während die Michaeliskonstante des unspezifischen Enzyms bei 10^{-5} M liegt. Dieser Unterschied in der Affinität der Enzyme zum Substrat ermöglicht eine Regulierung des Glucosestoffwechsels in der Leber. Die Leber verwertet den freien Zucker nur bei hohen Blutzuckerkonzentrationen zur Glykogenbildung, obwohl die Leberzellen für Glucose frei permeabel sind. Der Grund

hierfür liegt darin, daß die Glucokinase erst bei hohen Glucosekonzentrationen aktiv wird und die Glucosephosphorylierung erst jetzt den Wert erreicht, der zur Glykogensynthese benötigt wird (WEINHOUSE u.a. 1963; VINUELA u.a. 1963). Es wurden Versuche unternommen mit dem Ziel, etwas über die Lokalisation der beiden Glucose-phosphorylierenden Enzyme im Organ zu erfahren. Beide Enzyme sind cytoplasmatisch, und man fand Hinweise dafür, daß die unspezifische Hexokinase in den nicht parenchymatischen Zellen, die Glucokinase in den Parenchymzellen enthalten sein könnten (MANJESHWAR u.a. 1965; SOLS u.a. 1964; SHARMA u.a. 1964).

Die Glucokinase ist physiologisch sehr instabil. Bei kohlehydratfreier Ernährung und bei Diabetes nimmt der Glucokinasegehalt der Leber stark ab, bei Wiederverfütterung von Kohlehydraten, insbesondere freier Glucose, oder Insulingaben bei Diabetes nimmt die Aktivität wieder zu. Diese Zunahme beruht auf einer de novo Synthese des Enzyms (DI PIETRO u. WEINHOUSE 1960; VAUGHAN u.a. 1960; NIEMEYER u.a. 1962, 1963; ILYIN 1964; SHARMA u.a. 1964; SOLS u.a. 1964).

Eine weitere Eigenart des Enzyms besteht darin, daß es erst nach der Geburt in einem längeren Zeitraum gebildet wird. Im Foetus fehlt die Glucokinase, und die Leber der Mutter scheint die Kontrolle des Kohlehydratstoffwechsels mit zu übernehmen (WALKER 1962, 1963, 1965). Das gleiche gilt für die Fructo-1-Kinase der Leber (WALKER 1962, 1963a, 1965).

Die Glucokinase wird durch ihr Reaktionsprodukt G-6-P nicht gehemmt. Glucose ist nicht das einzige Substrat, es werden auch Mannose und 2-Desoxyglucose phosphoryliert (SALAS u.a. 1965). Die Bedeutung des Enzyms liegt aber im Umsatz der Glucose.

Weitere spezifische Hexokinasen bei Säugetieren sind die Galaktokinase der Leber, die bei Ratten gefunden

wurde und Galaktose sowie Galaktosamin in C-1-Stellung phosphoryliert (CARDINI u. LELOIR 1953), und zwei Enzymaktivitäten, die von den gleichen Autoren in Rattenorganen nachgewiesen wurden und durch die Acetylglucosamin am C-6 und Acetylgalaktosamin am C-1 phosphoryliert werden (LELOIR u. CARDINI 1958).

Bei den sog. Wirbellosen ist das Vorhandensein spezifischer Hexokinasen in zwei Fällen bekannt und zwar beim Hundebandwurm Echinococcus granulosus (AGOSIN u. ARAVENA 1959) und beim Pärchenegel Schistosoma mansoni (BUEDING u.a. 1954, 1955). Während die Säugetiere, bei denen eine spezifische Hexokinase nachgewiesen werden konnte, daneben immer noch eine unspezifische Hexokinase haben, scheinen diese beiden "Wirbellosen" nur hochspezifische Enzyme für die Zuckerphosphorylierung zu besitzen. Es wurden jeweils vier streng spezifische Hexokinasen durch Adsorption an Hydroxylapatit, Calciumphosphatgel oder Alumina-C_γ-Gel und nachfolgende Elution mit Puffern verschiedener Ionenstärke isoliert. Eine unspezifische Hexokinase wurde nicht gefunden. Die Enzyme unterschieden sich teilweise durch ihr Hemmverhalten und setzten jeweils nur einen Zucker, nämlich Glucose, Mannose, Fructose oder Glucosamin um. Phosphoryliert wurde in C-6-Stellung. Mit 2-Desoxyglucose war keine der Hexokinasen aktiv. Da diese Enzyme nur mit fünf Substraten getestet wurden, ist nicht auszuschließen, daß mit anderen, vielleicht unphysiologischen Zuckern doch noch eine Aktivität gefunden werden könnte. Alle mir bekannten, als spezifische Hexokinasen beschriebenen Enzyme setzen außer dem Hauptsubstrat noch weitere Zucker um (s. S. 5-7 und 57-58). So zeigt z.B. die hochspezifische Fructo-6-Kinase aus Erbsen, die mit 15 Zuckern getestet wurde, doch noch eine - wenn auch geringe - Aktivität mit Seduheptulose, Glucose und Mannose (MEDINA u. SOLS 1956). Auch die Galaktokinase der auf Galaktose oder Lactose gezogenen Hefe weist neben der Phosphorylierung der Galaktose am C-Atom 1 eine

geringere Aktivität mit 2-Desoxygalaktose, Galaktosamin, Talose (ALVARADO 1960; HEINRICH 1964) sowie Altrose (GANDER u. LEPKOWSKI 1962) auf; und die Glucokinase aus Escherichia coli ist außer mit Glucose auch mit Glucosamin aktiv (ASENSIO 1960).

2. Aufgabenstellung

Aus dem bisher Gesagten geht hervor, daß in einem Organismus eine oder mehrere Hexokinasen vorliegen können. Die Anregung zu der vorliegenden Arbeit ergab sich aus der Frage, ob bei einem Vertreter der decapoden Crustaceen, Orconectes limosus (RAFINESQUE), nur eine unspezifische Hexokinase vorhanden ist, oder ob die Phosphorylierung der freien Zucker durch mehrere, vielleicht spezifische Enzyme bewerkstelligt wird.

Die Gesamtaktivität der Hexokinase in den einzelnen Organen des Versuchstieres gegenüber Glucose war bereits von KELLER (1965) ermittelt worden. Die Aufgabe bestand nun darin, in einigen Organen des Flußkrebsses nachzuweisen, ob die von KELLER festgestellte Aktivität auf ein oder mehrere Enzyme entfällt. Außerdem sollte eine größere Anzahl von Zuckern als Substrate getestet werden.

Die Wahl des Versuchsobjektes ergab sich aus der Tatsache, daß der Flußkrebs nicht zuletzt auf Grund seiner handlichen Größe, leichten Beschaffung und bequemen Haltung als Hauptobjekt für ein Arbeitsprogramm des hiesigen Institutes gewählt wurde. Die Ziele dieses Programms, das sich mit der räumlichen Ordnung von Stoffwechselprozessen insbesondere bei sog. Wirbellosen beschäftigt, wurden von URICH mehrfach erläutert (URICH 1961, 1964).

M a t e r i a l u n d M e t h o d e n

1. Tiermaterial

Als Versuchsobjekt diente der Flußkrebs Orconectes limosus (RAFINESQUE) (= Cambarus affinis SAY). Die Tiere stammten aus der Havel und wurden in Beton- oder Eternitbecken unter fließendem Leitungswasser bei Temperaturen bis maximal 15°C gehalten. Wöchentlich erhielten sie eine sparsame Erhaltungskost, bestehend aus Fleisch, gekochten Kartoffeln und Möhr-rüben.

2. Präparation und Aufarbeitung

Die Tiere wurden innerhalb von 15 Minuten mit Chloroformdämpfen getötet. Sofort anschließend wurden die benötigten Organe (Antennendrüse, Herz, Enddarm) herauspräpariert, mit kalter physiologischer Lösung nach VAN HARREVELD (1936)¹⁾ kurz gespült und in mit Eis gekühlten Wägegläschen gesammelt. Vor der Frischgewichtsbestimmung wurden die Organe zur Entfernung anhaftenden Wassers auf Filtrierpapier kurz abgetupft. Die Homogenisation erfolgte in POTTER-ELVEHJEM-Homogenisatoren mit Teflonstempel in einem Tris-EDTA-Medium pH 7,6 (Tris²⁾ 10 mM + EDTA³⁾, Na-Salz 5 mM). Der Zusatz von EDTA diente zur Stabilisierung des Enzyms. Es wurden immer Organe aus mehreren Tieren vereinigt, um genügend aktive Homogenate zu erhalten. Bei den einzelnen Bestimmungen am Rohextrakt waren es meist drei Organe, bei den Reinigungsversuchen bis zu 150. Die Homogenisationszeit betrug drei Minuten. Das so gewonnene Rohhomogenat wurde, wenn nicht anders vermerkt, bei 20 000 g 20 Minuten unter Kühlung zentrifugiert. Der Überstand (Rohextrakt) wurde weiter verwendet.

1) zit. nach PROSSER (1961)

2) Trishydroxymethylaminomethan

3) Äthylendiamintetraessigsäure

3. Aktivitätsbestimmungen

Die Hexokinaseaktivität wurde nach folgenden Verfahren bestimmt:

a) Bestimmung über den Zuckerverbrauch im Ansatz

Die Methode beruht auf der Bestimmung des freien Zuckers vor und nach der Phosphorylierung (SOMOGYI 1945; CRANE u. SOLS 1955; KERLY u. LEABACK 1957 u.a.). Der Rohextrakt wurde im Reagenzglas mit ATP, MgCl_2 , KH_2PO_4 und jeweils verschiedenen Hexosen bei 25°C inkubiert. Der Zusatz von Phosphat diente zur Stabilisierung und Aktivitätserhöhung des Enzyms (CRANE u. SOLS 1953; TIEDEMANN u. BORN 1959). Siehe hierzu die Abb.1, S.12. Im Ansatz lagen folgende Endkonzentrationen vor:

Tris-Puffer pH 8,0	15 mM
ATP (Na-Salz)	10 mM
MgCl_2	50 mM
KH_2PO_4	20 mM
Hexose	3 mM

Für ATP und Mg^{++} wurden die geeigneten Konzentrationen in orientierenden Versuchen ermittelt (Abb.1 u.2, S.12). Gestartet wurde durch Zugabe von 0,5 ml Extrakt. Das Gesamtvolumen betrug 1 ml. In der gleichen Weise wurden Proben inkubiert, die kein ATP enthielten. Die Inkubationsdauer betrug wenn möglich 15 Minuten. Aus Abb.3, S.12 ist ersichtlich, daß die Aktivität nach dieser Zeit durch die Hemmwirkung der Reaktionsprodukte langsam abnimmt. Wenn mit sehr verdünnten Extrakten gearbeitet werden mußte, wie es z.B. nach der Chromatographie der Fall war, mußte die Inkubationsdauer dennoch auf 30 Minuten erhöht werden. Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 ml 0,3 n $\text{Ba}(\text{OH})_2$ und 2 ml 5%-iger ZnSO_4 -Lösung. Hierbei wurden die gebildeten Zuckerphosphate mitgefällt. Nach Zugabe von 5 ml H_2O wurden die Proben zweimal filtriert (Filtrierpapier Schleicher u. Schüll 602 eh und 587 E unter Zusatz von Hyflo-Supercel; siehe hierzu S.18)

Spez. Aktivität [nMol/mg Protein · min]

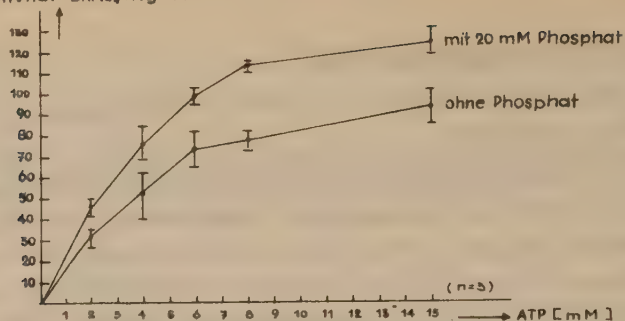


Abb. 1: Abhängigkeit der Aktivität von der ATP-Konzentration und der Zugabe von anorganischem Phosphat. (Rohextrakt der Antennendrüse; n = Anzahl der Meßwerte je Meßpunkt; Substrat: Glucose)

Spez. Aktivität [nMol/mg Protein · min]

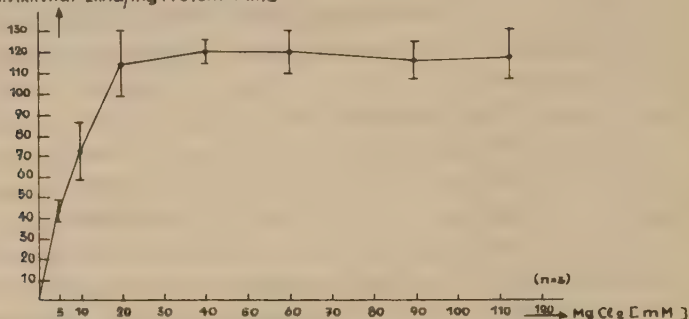


Abb. 2: Abhängigkeit der Aktivität von der Mg^{++} -Konzentration.

(Rohextrakt der Antennendrüse; n = Anzahl der Meßwerte je Meßpunkt; Substrat: Glucose)

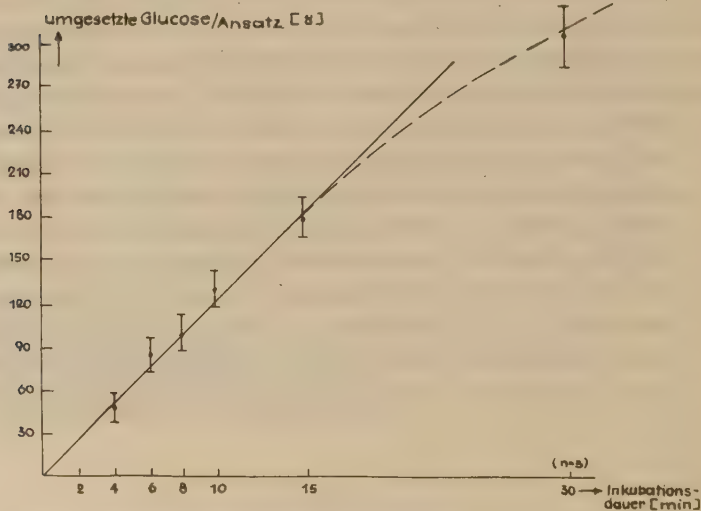


Abb. 3: Einfluß der Inkubationsdauer auf die Aktivität.

(Rohextrakt der Antennendrüse; n = Anzahl der Meßwerte je Meßpunkt)

und im Überstand der freie Zucker bestimmt. Aus der Differenz zwischen den Proben mit und ohne ATP wurde die durch die Hexokinase-reaktion verbrauchte Zuckermenge berechnet. Wenn nicht anders vermerkt, wurden Dreifachbestimmungen ausgeführt.

Die Bestimmung der freien Zucker erfolgte nach folgenden Methoden:

Glucose, Mannose, Galaktose, Glucosamin, Galaktosamin und Ribose wurden nach NELSON (1944)¹⁾ bestimmt. Hierbei wird Cu^{++} durch den Zucker zu Cu^+ reduziert, welches seinerseits Arsenmolybdänsäure zu Molybdänblau reduziert. Zur Bestimmung wurden 1 ml Überstand mit 1 ml Kupferreagenz 20 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen in fließendem Leitungswasser wurde 1 ml Arsenmolybdänsäurereagenz zugegeben und zur Farbentwicklung des öfteren geschüttelt. Nach Ende der Gasentwicklung wurde auf 25 ml verdünnt. Nach zwei Stunden wurden die Proben gegen einen Reagenzienleerwert im Photometer Eppendorf mit dem Filter 546 $\text{m}\mu$ in Küvetten mit 1 cm Schichtdicke gemessen. Hierbei ist die Extinktion dem Zuckergehalt von 5 - 200 μg proportional. Bei jeder Messung wurden Standardproben (100 μg Zucker/ml) mitgemessen.

Fructose wurde nach ROE (1934)¹⁾ bestimmt. Zu 1 ml Überstand wurden 0,5 ml Resorcinlösung und 3,5 ml 30%-ige Salzsäure zugesetzt und 10 Minuten bei 80°C im Wasserbad erwärmt. Nach Abkühlen wurde sofort bei 520 $\text{m}\mu$ im Zeiss-Spektrophotometer PMQ II gegen einen Reagenzienleerwert gemessen. Die Extinktion ist dem Zuckergehalt linear proportional zwischen 2 und 50 μg .

2-Desoxyglucose wurde nach DISCHE (1930)²⁾ mit Diphenylamin und Mineralsäure bestimmt. 1 ml Überstand wurde mit 2 ml Diphenylaminreagenz gemischt und 10 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt. Der entstehende blaue Farbstoff wurde im Photometer Eppendorf mit dem Filter 578 $\text{m}\mu$ gemessen. Die entsprechen-

1) zit. nach HINSBERG - LANG (1957)

2) zit. nach ASHWELL (1957)

den Zuckermengen wurden aus einer Eichkurve entnommen. $20\text{ }\mu\text{g}$ konnten noch nachgewiesen werden.

N-Acetylglucosamin wurde nach AMINOFF u.a. (1952)¹⁾ mit p-Dimethylaminobenzaldehyd nachgewiesen. Zu $0,5\text{ ml}$ Überstand wurden $0,05\text{ ml}$ $0,5\text{ n Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung gegeben. Nach Verschließen der Reagenzgläser durch kleine mit Wasser gefüllte Ampullen wurde vier Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Es folgten Kühlen in Eiswasser und Zusatz von $3,5\text{ ml}$ Eisessig und $0,5\text{ ml}$ Dimethylaminobenzaldehydlösung. Nach 90 Minuten wurden die Proben im Photometer Eppendorf bei $546\text{ m}\mu$ gemessen. $10\text{ }\mu\text{g}$ Zucker konnten noch gut nachgewiesen werden. Die Extinktion war dem Zuckergehalt bis $100\text{ }\mu\text{g}$ proportional.

Die Bestimmung der Fucose wurde nach DISCHE u. SHETTLES (1948)²⁾ mit der Cystein- H_2SO_4 -Reaktion ausgeführt. Zu 1 ml im Verhältnis $1:5$ verdünntem Überstand wurden $4,5\text{ ml}$ Säurereagenz zugesetzt. Nach 10 Minuten Erwärmen im kochenden Wasserbad und nachfolgendem Abkühlen wurde $0,1\text{ ml}$ Cysteinlösung zugegeben. Im Zeiss-Spektrophotometer wurde nach zwei Stunden die Extinktion bei 396 und $427\text{ m}\mu$ gemessen. Die Differenz $\Delta E_{396-427}$ war dem Zuckergehalt von $1 - 25\text{ }\mu\text{g}$ proportional.

Die beschriebene Methode der Messung des Zuckerverbrauchs wurde für die meisten Aktivitätsbestimmungen gewählt, da mit ihr alle Zucker als Substrate untersucht werden konnten und eine große Anzahl von Proben gleichzeitig bearbeitet werden konnte. Dies war besonders wichtig bei Aktivitätsbestimmungen nach Chromatographie und Spezifitätsuntersuchungen an einem Extrakt mit mehreren Substraten. Die Fehlerbreite der Bestimmung über den Zuckerverbrauch betrug $\pm 0,012$ Extinktionseinheiten.

1) zit. nach PLOETZ (1955)

2) zit. nach ASHWELL (1957)

b) Bestimmungen im optischen Test

Bei dieser Methode wird die Hexokinasereaktion mit Reaktionen gekoppelt, die NAD¹⁾ oder NADP²⁾ reduzieren oder die reduzierten Coenzyme NADH₂ bzw. NADPH₂ oxydieren. Da die reduzierte Form der Coenzyme im Gegensatz zur oxydierten Form bei 340 m μ ein Absorptionsmaximum besitzt, ist es möglich, den Umsatz direkt im Spektrophotometer zu verfolgen.

Mit Glucose als Substrat kann die Phosphorylierung mit der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Reaktion (G-6-P-DH) gekoppelt werden. Dieses Enzym oxydiert das gebildete G-6-P zu 6-Phospho-Gluconat und überträgt den Wasserstoff auf NADP. Die Zunahme der Extinktion wurde bei 366 m μ im Photometer Eppendorf gemessen und der Reaktionsablauf direkt mit einem Kompensationsschreiber der Fa. Philips/Hamburg mit Linearisierungsglied aufgeschrieben. Der Extinktionskoeffizient für NADH₂ und NADPH₂ beträgt bei 366 m μ $3,3 \cdot 10^6$ cm²/Mol (bei 25°C), d.h. eine Extinktionsänderung von 0,100 entspricht einem Substratumsatz von $3,03 \cdot 10^{-2}$ Mol/ml Küvetteninhalt bei einer Schichtdicke von 1cm. Die Küvette stand während der Messung, die bei 25°C durchgeführt wurde, in einem temperierten Küvettenhalter. Sie hatte eine Schichtdicke von 1 cm und enthielt in einem Gesamtvolumen von 2,21 ml alle Komponenten des Systems in folgenden Endkonzentrationen (THIELMANN u. BLUME 1962; KELLER 1965):

Tris-Puffer pH 8,0	34	mM
MgCl ₂	10	mM
ATP (Na-Salz)	2,5	mM
Glucose	1,0	mM
NADP	0,36	mM
G-6-P-DH	0,9	μ g/ml Testansatz
Extrakt	0,5	ml

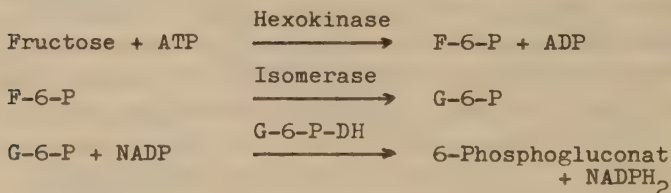
1) Nicotinamidadenindinucleotid

2) Nicotinamidadenindinucleotid-Phosphat

Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe der Glucose. Eine Reaktion mit endogenem Substrat konnte nicht festgestellt werden.

Diese Bestimmung wurde für kürzere Meßreihen angewendet, bei denen es nur auf den Glucoseumsatz ankam.

Für die Bestimmung der Michaeliskonstanten für Fructose und Mannose war die unter a) beschriebene Methode nicht anzuwenden, da hierbei nur ein enger Konzentrationsbereich untersucht werden kann und bei sehr niedrigen Konzentrationen die Messung auf Grund des Differenzverfahrens ungenau wird oder völlig versagt. Es wurde hier ebenfalls im optischen Test gearbeitet. Die Fructosephosphorylierung wurde mit Phosphoglucoseisomerase und G-6-P-DH gekoppelt. Die Reaktionen sind also:¹⁾



(BERGMAYER 1962)

Die Endkonzentrationen in der Küvette bei einem Gesamtvolumen von 2,22 ml waren:

Tris-Puffer pH 7,8	34	mM
MgCl ₂	10	mM
ATP	2,5	mM
Fructose	2 bis 0,1	mM
NADP	0,36	mM
G-6-P-DH	0,9	µg/ml Testansatz
PGI	4,5	µg/ml Testansatz
Extrakt	0,5	ml

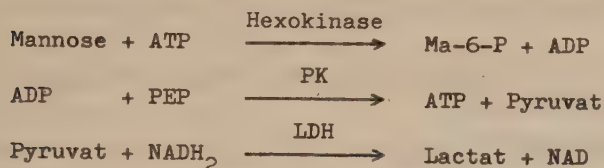
Die Messung wurde wie oben angegeben durchgeführt. Ein Leerwert ohne Substrat wurde nicht gefunden.

Mit Mannose als Substrat wurde die gebildete ATP-

¹⁾ Benutzte Abkürzungen:

F-6-P	Fructose-6-Phosphat
PGI	Phosphoglucoseisomerase

Menge als Substrat für folgende Reaktionen benutzt:¹⁾



(MATTENHEIMER 1961)

Der Testansatz von 2,22 ml Gesamtvolumen hatte folgende Endkonzentration:

KCl	60	mM
Tris-Puffer pH 7,8	34	mM
MgSO ₄	20	mM
ATP	2,5	mM
NADH ₂	0,5	mM
PEP	0,5	mM
Mannose	1 bis 0,01	mM
LDH	4,5	µg/ml Testansatz
PK	4,5	µg/ml Testansatz
Extrakt	0,5	ml

Die Abnahme der Extinktion während der Reaktion wurde wie bereits angegeben verfolgt. Vor der Zugabe von Mannose wurde vier Minuten lang die Reaktion ohne zugesetztes Substrat registriert. Bei der Aktivitätsberechnung wurde dieser endogene Umsatz von der Gesamtreaktion mit Substrat subtrahiert.

4. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der untersuchten Extrakte wurde nach LOWRY u.a. (1951)²⁾ mit dem Reagenz nach FOLIN-CIOCALTEU bestimmt. Die Proben wurden zwei Stunden nach Reagenzzugabe im Zeiss-Spektrophotometer bei 750 mµ gegen einen Reagenzienleerwert gemessen. Die der Extinktion entsprechende Proteinmenge wurde einer

¹⁾ Benutzte Abkürzungen:
 Ma-6-P Mannose-6-Phosphat
 PEP Phosphoenolpyruvat
 PK Pyruvatkinase
 LDH Lactatdehydrogenase

²⁾ zit. nach COWGILL u. PARDEE (1957)

für kristallines Rinderserumalbumin aufgestellten Eichkurve entnommen.

5. Verfahren zur Reinigung und Trennung der Hexokinaseaktivität

a) Ammoniumsulfat-Fällung

Eine oft angewandte Methode zur Trennung von Proteinen ist die Fraktionierung durch Salzzugabe. Hierbei hat sich das $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nicht zuletzt wegen seiner hohen Löslichkeit als besonders geeignet erwiesen.

Der 20 000 g-Überstand eines Homogenats aus etwa 30 Antennendrüsen wurde so verdünnt, daß der Proteingehalt ungefähr 1 - 2 mg Protein/ml betrug. Die Fällungen und die nachfolgenden Operationen wurden bei 4°C durchgeführt. Unter ständigem Rühren der Lösung wurde festes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zugegeben und hierbei der pH-Wert der Lösung durch Einstellen mit NH_3 zwischen 7,5 und 8,0 gehalten. Die Anordnung zur pH-Messung bestand aus den Schott-MeBelektroden 9516 gegen 9818 und dem Meßverstärker Knick pH 35. Nach Erreichen der gewünschten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration wurde die Lösung für mindestens eine Stunde im Kühlschrank belassen. Der Niederschlag wurde in einem kleinen Büchnertrichter, auf dessen Filterpapier eine Lage Hyflo-Supercel aufgebracht wurde, unter Saugen aufgefangen. Durch das Hyflo-Supercel sollte verhindert werden, daß ein Teil des Niederschlages durch die Filterporen läuft. Die abgesaugte Lösung wurde zur weiteren Fällung verwendet. Nach Behandlung des Filterkuchens mit dem Tris-EDTA-Medium (Tris 10 mM, EDTA 5 mM) wurde abzentrifugiert, der Niederschlag nochmals mit Tris-EDTA gewaschen und zum zweitenmal abzentrifugiert. Die beiden Überstände wurden vereinigt und auf ihre Aktivität untersucht.

b) Chromatographie an Ionenaustauschern

Bei diesem Verfahren werden die Proteine im Extrakt

mehr oder weniger stark an Cellulose-Ionenaustauschern adsorbiert und durch Elution nacheinander von diesen wieder abgelöst.

Benutzt wurden verschiedene Ionenaustauscher der Fa. Serva/Heidelberg:

DEAE-Cellulose (basischer Cellulose-Ionenaustauscher)

CM-Cellulose (saurer Cellulose-Ionenaustauscher)

Hydroxylapatit-Cellulose und

DEAE-Sephadex (Fa. Pharmacia/Uppsala).

Die Ionenaustauscher wurden nach Vorschrift mit dem zuerst zu verwendenden Elutionspuffer äquilibriert und je nach Verwendungszweck in Säulen von verschiedenen Abmessungen gepackt. Diese waren im untersten Teil mit wenig Glaswolle abgeschlossen. Sie wurden in einen Kühlmantel eingesetzt, durch den während der Chromatographie Wasser von 4-6°C zirkulierte. Der Durchfluß durch die Säule wurde mit einer Desaga-Dosierpumpe reguliert. Als Versuchsmaterial diente zu meist der Überstand des Homogenats bei 20 000 g.

Je nach Größe der Säule wurde eine bestimmte Menge dieses Überstandes vorsichtig auf die Säule aufgebracht. Eluiert wurde nacheinander mit folgenden Lösungen und Gradienten:

DEAE-Cellulose und DEAE-Sephadex:

1. Vorlauf: Tris-Puffer 50 mM + EDTA 5 mM; pH 7,8

2. Kontinuierlicher linearer pH-Gradient:

Tris-Acetat-Puffer 50 mM + EDTA 5 mM; pH 6,3
gegen obigen Puffer

3. Kontinuierlicher linearer NaCl-Gradient 0 → 1 M:

gepufferte NaCl-Lösung 1 M gegen Puffer unter 2.

CM-Cellulose:

1. Vorlauf: Tris-Acetat-Puffer 50 mM + EDTA 5 mM;
pH 6,3

2. Kontinuierlicher linearer pH-Gradient:

Tris-Puffer 50 mM + EDTA 5 mM; pH 7,8 gegen obigen Puffer

3. Kontinuierlicher linearer NaCl-Gradient 0 → 1 M:

gepufferte NaCl-Lösung 1 M gegen Puffer unter 2.

Hydroxylapatit-Cellulose:

1. Vorlauf: Tris-Puffer 5 mM + EDTA 5 mM; pH 7,6
2. Kontinuierlicher linearer Gradient:
Tris-Puffer 200 mM + EDTA 5 mM; pH 7,6 gegen
obigen Puffer
3. Kontinuierlicher linearer NaCl-Gradient 0 → 1 M:
gepufferte NaCl-Lösung 1 M gegen Puffer unter 2.

Die kontinuierlichen linearen Gradienten wurden mit Hilfe zweier verbundener Zylinder erhalten (Prospekt der Fa. Serva/Heidelberg). Das Volumen der Elutionsmittel war in den einzelnen Versuchen etwas verschieden.

Die Fraktionen wurden automatisch in bestimmten vorgegebenen Zeitintervallen aufgefangen. Hierzu diente der Fraktionensammler der Fa. Serva/Heidelberg, der mit einem selbstgefertigten Kühlmantel versehen worden war. Zwischen Säule und Ausfluß in die Sammelröhrchen waren mehrere Meßgeräte geschaltet, mit denen die Eigenschaften des Eluates kontinuierlich bestimmt werden konnten:

Mit dem LKB-Uvicord konnte der Proteingehalt spektrophotometrisch als Absorption bei 254 m μ gemessen und mit einem angeschlossenen Schreiber direkt registriert werden.

Mit den Schott-Meßelektroden 9516 gegen 9818 und dem Meßverstärker Knick pH 71 wurde der pH-Wert des Eluates überprüft.

Die Menge an zugesetztem Salz im Gradienten wurde durch eine Leitfähigkeitsmessung mit dem Gerät der Fa. Püsl/München und der Meßzelle PR 9513 der Fa. Philips verfolgt.

Die einzelnen Fraktionen wurden getrennt auf Hexokinaseaktivität untersucht. Hierbei wurde der Zuckerverbrauch im Ansatz bestimmt (s.S. 11 ff.). Der Testansatz hatte die auf Seite 11 angeführte Zusammensetzung, nur wurde als Substrat ein Gemisch aus Glucose, Mannose und Fructose mit einer Endkonzentration von 1,5 mM je Zucker eingesetzt. Inkubiert wur-

de 90 Minuten, da es nicht auf eine quantitative Bestimmung der Aktivität ankam, sondern nur auf den Nachweis einer Aktivität. Statt eines einzelnen Substrats wurde das Substratgemisch gewählt, um eine möglicherweise vorhandene spezifische Hexokinase nicht zu übersehen.

Einmal benutzte Cellulosen wurden vor Wiederverwendung laut Prospekt der Fa. Serva mit HCl und NaOH regeneriert.

c) Gelfiltration

Bei diesem Verfahren werden Proteine auf Grund ihrer unterschiedlichen Molekülgröße getrennt. Als Trennmateriale dienten Dextranbeads mit verschiedenem Vernetzungsgrad, und zwar die durch die Fa. Pharmacia/Uppsala erhältlichen

Sephadex G 100, mit einer Ausschlußgröße vom Molekulargewicht 100 000

Sephadex G 200, mit einer Ausschlußgröße vom Molekulargewicht 200 000.

Die Versuche wurden mit der auf Seite 19-20 beschriebenen Apparatur durchgeführt, nur wurde ohne Pumpe gearbeitet. Die Säule (700 x 15 mm) wurde mit dem Sephadex gepackt, und zur Elution wurde Tris-Puffer 50 mM + EDTA 5 mM, pH 7,8 verwendet. Die Aktivitätsbestimmung in den einzelnen Fraktionen erfolgte wie oben beschrieben mit dem Zuckergemisch.

Sephadex G 25 wurde zum Entsalzen aktiver Fraktionen benutzt.

Zum Konzentrieren sehr verdünnter Enzympräparationen wurde Sephadex G 25 coarse im "batch"-Verfahren verwandt. Die gequollenen Beads wurden mit Korbeinsätzen in der Eispirouette (Fa. Phywe/Göttingen) abfiltriert.

d) Gel-Elektrophorese

Angaben über die Elektrophorese an Polyacrylamidgelen wurden Arbeiten von RAYMOND u. WANG (1960); JO-

VIN u.a. (1964); DAVIS (1964); ORNSTEIN (1964);
LIMA u.a. (1965) u.a. entnommen.

Die Polymerisation der Gele erfolgte nach Vorschriften aus Prospekten der Canal Industrial Corporation/Bethesda. Gearbeitet wurde in den meisten Fällen mit dem Standard upper- und lower-gel. Einige Versuche wurden auch mit dem pH 6,6 gel ausgeführt. Dieses zeigte aber eine geringere Trennschärfe als das Standardgel, und die Ausbeute an aktivem Enzym war auch nicht günstiger. Die Gele wurden in Röhrchen von 10 mm Durchmesser polymerisiert. Die gesamte Trennstrecke im lower-gel betrug 43 mm. Es wurde im vertikalen Verfahren gearbeitet. Die die Gele enthaltenden Röhrchen verbanden zwei Puffergefäße miteinander, in denen als Elektroden Platindrähte eingelegt waren. Das obere Gefäß enthielt die Kathode, das untere die Anode. Die Versuche wurden im Kühlschranks ausgeführt. Als Puffer diente laut Prospekt ein Glycin-Tris-Puffer pH 8,3. Im unteren Puffergefäß war so viel Puffer enthalten, daß die gesamte Gellänge von kalter Pufferlösung umgeben war. Gleichzeitig wurde die untere Pufferlösung mit einem Magnetührer durchmischt, um die durch den Stromdurchgang entstehende Wärme möglichst rasch von den Gelen abzuführen. Als Speisegerät diente das Gleichstromgerät Elphor H der Fa. Bender & Hobein/München. Die Extrakte wurden mit Saccharose auf eine Konzentration von 20% gebracht und mit einer Kapillarpipette unter die obere Pufferlösung auf die Gele aufgegeben (ungefähr 1 mg Protein/Rohr). Als Indikator für das am schnellsten wandernde Protein wurde Bromphenolblau zum Extrakt zugesetzt. Bis die Probe in das upper-gel eingedrungen war, wurde mit 100 V Spannung gearbeitet, dann erfolgte eine Erhöhung der Klemmenspannung auf 200 V, entsprechend ungefähr 15 mA/Rohr. Die Stromstärke nahm mit der Zeit etwas ab. Die Elektrophorese wurde nach 60 bis 70 Minuten abgebrochen, wenn die Bromphenolblaubande den unteren

Rand des Röhrchens erreicht hatte.

Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, wurden die aus den Röhrchen entfernten Gele 20 Minuten in einer Farblösung von folgender Zusammensetzung belassen:

in 100 ml wässriger Lösung	0,5 g	Amidoschwarz 10B
	5 g	HgCl ₂
	5 ml	Eisessig

(WIEME u. RABAEY 1957).

Danach wurden sie in die Röhrchen zurückgebracht und die überschüssige Farbe in der oben beschriebenen Anordnung elektrophoretisch entfernt. Hierbei enthielten die Puffergefäße 7%-ige Essigsäure, die Kathode lag wieder im oberen Gefäß, die Anode im unteren. Die Entfärbung dauerte 3 bis 5 Stunden bei einer Klemmenspannung von 200 V. Die entfärbten Gele konnten in 7%-iger Essigsäure einige Zeit aufbewahrt werden.

Der Nachweis der Hexokinaseaktivität auf dem Gel scheiterte, weil vermutlich die Enzymmengen zu gering waren. Da auch hier mit verschiedenen Substraten getestet werden sollte, wurde versucht, die bei der Hexokinasereaktion freiwerdenden H⁺-Ionen durch Indikatorumschlag auf dem Gel nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurden die Gele entweder in Indikatorlösung vorgebadet und dann in einer Lösung, die alle Komponenten für die Reaktion enthielt, inkubiert, oder sie wurden mit einem 2%-igen Agar zusammengebracht, der alle Substrate, Cofaktoren und den Indikator enthielt (TRAYSER u. COLOWICK 1961). Als Indikatoren wurden Neutralrot und Bromphenolblau verwendet. An den Stellen des Gels, an denen aktives Enzym vorhanden war, sollte der Farbumschlag vom Basischen zum Säuren stattfinden. Dieser wurde aber nur einmal mit einer großen Menge an käuflicher Hefehexokinase erhalten. Dies spricht dafür, daß dieser Nachweis nur mit Material hoher Aktivität möglich ist; die Aktivität der Hexokinase aus den Orconectes-Organen reichte hierfür

nicht aus. Zum Aktivitätsnachweis wurden die Gele daher in 2,5 mm breite Scheiben geteilt und einzeln mit Tris-EDTA-Medium eluiert. In einem Versuch wurden jeweils sechs Röhrchen der Elektrophorese unterworfen, von denen eines auf Protein gefärbt wurde. Die restlichen wurden zerschnitten und entsprechende Gelscheiben vereinigt. Letztere wurden unter Zusatz von 5 ml Tris-EDTA-Lösung mit dem Atommixmill der Fa. Lahl/Müllheim zerkleinert. Die Proben wurden dann eingefroren, wieder aufgetaut und noch drei Stunden im Kühlschrank belassen. Dann wurde der Überstand unter Kühlung im Zentrifugalfeld abfiltriert. An ihm erfolgte dann die Aktivitätsbestimmung mit dem Zuckergemisch wie unter dem Abschnitt "Chromatographie an Ionenaustauschern" beschrieben.

Für einige Vorversuche mit käuflicher Hefehexokinase wurden auch 1%ige Agargele (Agar für Immunelektrophorese in Borat-Puffer 30 mM pH 8,2) als Trägermaterial verwendet. Die heißen flüssigen Gele wurden in zusammensetzbare Trovidur-Tröge (160 × 40 × 12 mm) gegossen. An den beiden Stirnseiten der Tröge wurden Filterkartonstücke (Schleicher u. Schüll 404) mit eingegossen, die aus dem Gel herausragten und als Ansatzstelle für die Verbindungen zum Elektrodenpuffer dienten. Nach dem Erhärten der Gelplatten wurden Substanzproben auf Filterkartonstreifen (Schleicher u. Schüll 404) in einen Schlitz im Gel eingesetzt, welcher darauf mit noch gerade flüssigem Agar geschlossen wurde. Die Elektrophorese erfolgte horizontal zwischen zwei Kühlplatten. Als Verbindung zwischen den Kartonstücken im Gel und dem Elektrodenpuffer (Borat-Natronlauge 300 mM pH 8,2) dienten Papierstreifen (Kleenex). Da das Gel während der Elektrophorese an der Kathodenseite schrumpfte oder sogar einriß, wurde bei den folgenden Versuchen der Plattenteil vom Startschlitz bis zur Kathode aus Hyflo-Supercel statt aus Agar hergestellt. Der Aktivitätsnachweis auf dem Gel mit Hilfe der Indikator-

methode glückte auch nur mit hohen Konzentrationen an Hefehexokinase. Das Enzym wurde hier ebenfalls wie auf S.24 beschrieben extrahiert und die Aktivität im Überstand bestimmt.

6. Identifizierung der Endprodukte der Phosphorylierung

Es kam eine Methode zur Anwendung, die von LANGE u. KOHN (1961) beschrieben wurde. 0,5 ml Extrakt wurden mit dem zu testenden Zucker bei 25°C zwei Stunden in einem Ansatz folgender Endkonzentration inkubiert:

Tris-Puffer pH 8,0	15 mM
MgCl ₂	50 mM
ATP	10 mM
Zucker	6 mM

Das Gesamtvolumen betrug 1 ml. Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 ml absoluten Alkohols. Kleine Proben dieser Lösung wurden auf säuregewaschenes Chromatographiepapier (Schleicher u. Schüll 2043b gew.) aufgetragen und aufsteigend mit dem Laufmittel Äthylacetat:Pyridin:Wasser = 10:4:3 (v/v) zwei Stunden chromatographiert. Hierbei werden die freien Zucker abgetrennt und die Phosphate (Zucker-Phosphate, ATP, anorganisches Phosphat) bleiben am Startpunkt liegen. Zur Entwicklung wurden die an der Luft getrockneten Chromatogramme zuerst mit FeCl₃-Lösung 10 mM und anschließend mit K₄[Fe(CN)₆]-Lösung 10 mM besprüht (SHINAGAWA u.a. 1955)¹⁾. Die Phosphate erschienen als weiße Flecken auf blauem Untergrund am Startpunkt. Danach wurde das Chromatogramm auf reduzierende Zucker mit dem Anilinphthalatreagenz (STAHL 1962) entwickelt. Die freien Zucker und die Zucker-6-Phosphate, die ja noch reduzierende Wirkung haben, erschienen als braune Flecken. Da durch Spezifitätsuntersuchungen bekannt war, welcher Zucker überhaupt phosphoryliert wurde, bedeutete das Auftreten einer Braunfärbung am Startpunkt der Zucker, die als Sub-

¹⁾ zit. nach HETTLER (1959)

strate dienen, daß das Reaktionsprodukt ein Zucker-6-Phosphat war. Blieb der Phosphatfleck bei diesen Zuckern dagegen bei Sprühen mit Anilinphthalat weiß, so deutete dies auf ein Zucker-1-Phosphat.

7. Fehlerangaben, Statistik

Zu allen Werten, die Mittelwerte aus drei oder mehr Messungen darstellen, wurde die mittlere quadratische Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert (=Standardabweichung)

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad n = \text{Anzahl der Messungen}$$

hinzugefügt.

Zur Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Meßreihen wurde das χ^2 -Verfahren, das t-Verfahren und der F-Test angewandt (LINDER 1959; BELITZ 1960). In die Tabellen wurden folgende Werte aufgenommen:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}} \quad \begin{array}{l} \bar{x}_1 = \text{Mittelwert der} \\ \quad \quad \quad 1. \text{ Meßreihe} \\ \bar{x}_2 = \text{Mittelwert der} \\ \quad \quad \quad 2. \text{ Meßreihe} \end{array}$$

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

und die Wahrscheinlichkeit P dafür, daß die Meßreihen der gleichen Grundgesamtheit entstammen.

Ergebnisse

1. Bestimmungen am Rohextrakt

Der erste Teil der Untersuchungen wurde am Rohextrakt vorgenommen, um einige Eigenschaften des Enzyms festzustellen und vielleicht schon Hinweise auf das Vorliegen von mehreren Enzymen zu finden. Als Material wurden die Organe des Flußkrebsees gewählt, die nach KELLER (1965) die höchste Hexokinaseaktivität aufweisen: Antennendrüse, Enddarm und Herz. Die meisten Versuche wurden an Homogenaten der Antennendrüse durchgeführt. Es wurde das ganze Organ mit Ausnahme der Harnblase verwendet.

a) pH-Aktivitätskurve

Zur Bestimmung des für die Hexokinasereaktion optimalen pH-Wertes wurde eine pH-Aktivitätskurve am Rohextrakt der Antennendrüse zwischen pH 7 und pH 9 (Tris-Puffer) aufgenommen. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im optischen Test mit Glucose als Substrat. Aus Abb.4 ist ersichtlich, daß zwischen pH 7,7 und pH 9,0 der pH-Wert keinen Einfluß auf die Aktivität hat. In allen folgenden Versuchen wurde bei Aktivitätsbestimmungen ein pH-Wert von 8,0 eingehalten.

b) Verteilung des Enzyms in der Zelle

Da Hexokinasen, wie auf S.4 erwähnt, partikulär gebunden sein können, wurden die drei untersuchten Organe jeweils in Tris-EDTA-Medium homogenisiert und bei 20 000 g 20 Minuten zentrifugiert. Aktivitätsbestimmungen im optischen Test mit Glucose als Substrat am Überstand und dem ungewaschenen Niederschlag zeigten, daß die gesamte Aktivität im Überstand enthalten war. (Tab.1). Auch beim Zentrifugieren bei 100 000 g in der Ultrazentrifuge (SPINCO Model L) fand sich die gesamte Aktivität im Überstand. Das Enzym aus Orconectes limosus ist also löslich. Es konnte daher immer mit dem Überstand bei 20 000 g gearbeitet werden (Rohextrakt).

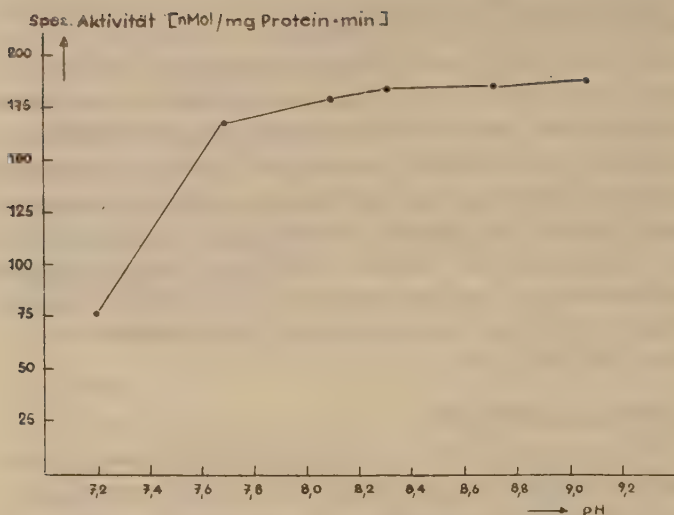


Abb. 4: Einfluß des pH-Wertes im Inkubationsgemisch auf die Aktivität (Rohextrakt der Antennendrüse).

Organ	Gesamtaktivität [nMol/min]		Anteil an der Gesamtaktivität [%]	
	Überstand	Nieder-schlag	Überstand	Nieder-schlag
Antennen-drüse	464,0	5,4	98,9	1,1
Enddarm	339,0	5,0	98,6	1,4
Herz	259,0	3,8	98,5	1,5

Tab.1: Verteilung der Hexokinaseaktivität in der Zelle

c) Einfluß des Geschlechtes auf die Enzymaktivität

Als nächstes wurde geprüft, ob das Geschlecht der Tiere einen Einfluß auf die Enzymaktivität hat. Die Rohextrakte der Antennendrüsen von je vier Weibchen

und vier Männchen wurden mit der auf S.11 ff. beschriebenen Methode auf ihre Aktivität gegenüber Glucose und Mannose untersucht. Nach Tab.2 bestehen zwischen den Geschlechtern keine signifikanten Unterschiede.

	spezifische Aktivität [nMol/mg Protein·min]		relative Rate Glucose: Mannose
	Glucose	Mannose	
Weibchen	133,5 ± 20,9	196,3 ± 29,6	1 : 1,47
Männchen	144,5 ± 32,3	197,8 ± 38,7	1 : 1,37
n	4	4	
t	2,289	0,2464	
P	0,063	0,81	

Tab.2: Spezifische Aktivitäten des Rohextraktes der Antennendrüse von Weibchen und Männchen gegenüber Glucose und Mannose.

In den folgenden Versuchen wurden dennoch fast ausschließlich Weibchen verwendet, da diese in größerer Menge zur Verfügung standen als Männchen.

Der Einfluß der Häutung auf die Hexokinaseaktivität wurde nicht untersucht. Es kamen fast nur Tiere zur Verwendung, die keine Gastrolithen aufwiesen, sich also in der Zwischenhäutungsphase befanden.

d) Stabilität der Enzymaktivität

Eine sehr günstige Voraussetzung für eine Enzymreinigung oder -trennung ist eine möglichst große Stabilität des zu untersuchenden Enzyms. Leider zeigte sich, daß die Hexokinasen des Flußkrebsses recht instabil sind und die Aktivität sehr leicht zerstört wird.

Am Rohextrakt der Antennendrüse wurde der Einfluß des pH-Wertes und der Ionenstärke im Extrakt auf die

Stabilität untersucht. Um den Einfluß des pH-Wertes festzustellen, wurde das Gewebe in Tris-Acetat-Puffer 100 mM + EDTA 5 mM, pH 7 homogenisiert und anschließend zentrifugiert. Einzelne Proben dieses Extraktes wurden dann mit NaOH oder HCl auf den gewünschten pH-Wert gebracht und entweder 2 Stunden bei 25°C oder 24 Stunden bei 2-4°C gelagert. Anschließend wurde die Aktivität der einzelnen Proben im optischen Test mit Glucose als Substrat bestimmt. Aus Abb.5 ist ersichtlich, daß das Enzym bei neutralem pH am stabilsten ist und daß unter den geschilderten Bedingungen bei pH 5 bzw. pH 9 bereits mehr als 50% der Aktivität zerstört werden. Es mußte also in einem Bereich zwischen pH 6 und pH 8 gearbeitet werden.

Um den Einfluß der Ionenstärke auf die Aktivität zu prüfen, wurden Antennendrüsen in Tris-Puffer 10 mM + EDTA 5 mM, pH 7,4 homogenisiert. Der nach dem Zentrifugieren erhaltene Überstand wurde in einzelne Proben geteilt, zu denen gepufferte NaCl-Lösung zugegeben wurde, um bestimmte Endkonzentrationen an NaCl zu erhalten. Nach 24stündiger Lagerung bei 2-4°C erfolgte die Aktivitätsbestimmung im optischen Test. Der Zusatz von NaCl bewirkte ebenfalls eine Abnahme der Aktivität (Abb.6). Da bei der Trennung der Aktivitäten eine der beiden Hexokinasen nur mit recht hohen Konzentrationen an NaCl vom Ionenaustauscher abgelöst werden konnte, wurde es nach dem aus Abb.6 ersichtlichen Abfall der Aktivität im Beisein von NaCl notwendig, die aktive Fraktion nach der Chromatographie möglichst rasch durch Gelfiltration zu entsalzen.

Bei vier verschiedenen Rohextrakten der Antennendrüse in Tris-Puffer 10 mM + EDTA 5 mM, pH 7,2 bis 7,4 wurde die Inaktivierung während der Lagerung bei 2-4°C über längere Zeit verfolgt. Die Aktivitäten wurden im optischen Test bestimmt. Abb.7 zeigt, daß die Extrakte trotz gleicher Behandlung unterschiedlich schnell inaktiviert wurden. Welche Faktoren für

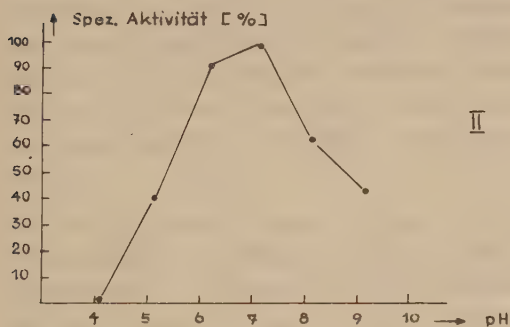
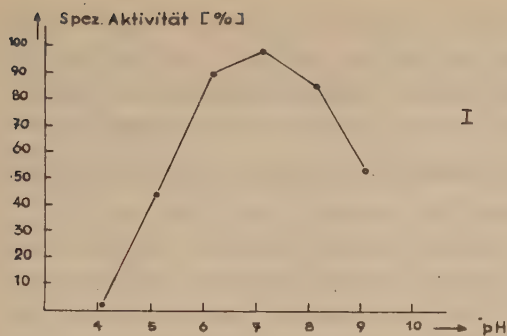


Abb. 5: Einfluß des pH-Wertes im Extrakt auf die Stabilität der Enzymaktivität (Rohextrakt der Antennendrüse).

I : Proben 2 h bei 25 °C gelagert

II : Proben 24 h bei 2 - 4 °C gelagert

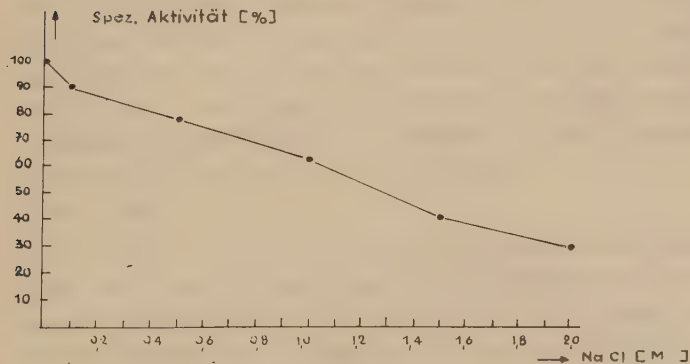


Abb. 6: Einfluß der Ionenstärke im Extrakt auf die Stabilität der Enzymaktivität (Rohextrakt der Antennendrüse).

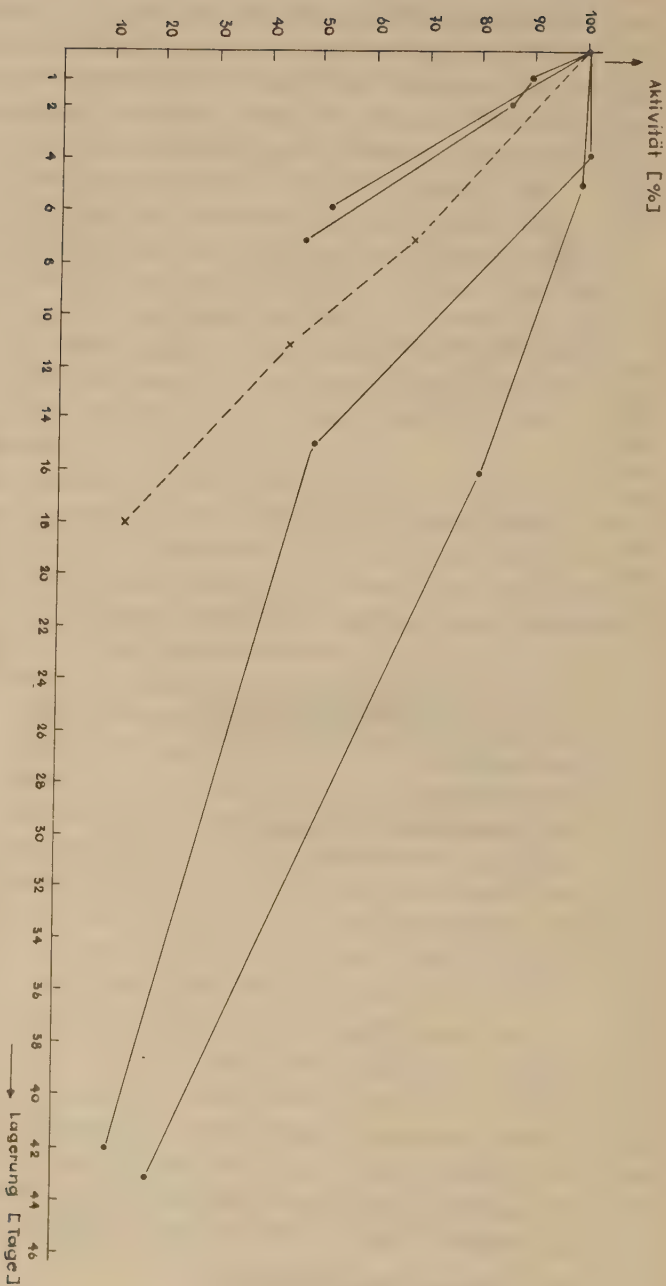


Abb. 78 Abnahme der Aktivität im Extrakt bei Lagerung bei 2 - 4 °C mit der Zeit.

- ——— • 4 Robaxtracta der Antennenspitze in Tris-Puffer 10 mM + EDTA 5 mM; pH 7,2 - 7,4
- x ——— x Fraktion II in Tris-Puffer 50 mM + EDTA 5 mM; pH 7,6

diese Unterschiede verantwortlich sind, ist unklar. Die in der Abbildung gestrichelt eingetragene Linie stellt die Inaktivierungskurve der Fraktion II nach Chromatographie an DEAE-Cellulose dar (s.S.36 ff.).

e) Aktivität des Rohextraktes gegenüber sechs Zuckern

Um eventuell einen Hinweis auf das Vorliegen von verschiedenen Hexokinasen zu erhalten, wurde die Phosphorylierung von sechs Zuckern durch die Rohextrakte von Antennendrüse, Enddarm und Herz untersucht. Die Aktivitäten wurden über den Zuckerverbrauch im Ansatz bestimmt. Alle sechs Zucker - Glucose, Mannose, Galaktose, Fructose, Glucosamin, 2-Desoxyglucose - wurden am gleichen Extrakt getestet. Für jeden Extrakt wurden die Organe von drei Tieren vereinigt. Die Ermittlung des Zuckerumsatzes erfolgte in Einzelbestimmungen.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tab.3 zusammengefaßt. Dabei ist die Aktivität gegenüber Glucose gleich 1 gesetzt und die Phosphorylierung der übrigen Zucker darauf bezogen. Aus der Streuung zeigt sich, daß die Werte für die einzelnen Zucker, besonders bei Enddarm und Herz, stark schwanken. Dies mag vielleicht auf der Empfindlichkeit des Enzyms beruhen. Zum anderen hat man bei Bestimmungen am Rohextrakt ein System vor sich, in dem sich nicht zu übersehende Einflüsse bemerkbar machen können, die möglicherweise zu den beobachteten starken Schwankungen führen könnten. Bei dem Versuch, Unterschiede in der Aktivität gegenüber bestimmten Zuckern zwischen den drei Organen zu sichern, wurde nur ein signifikanter Unterschied zwischen Antennendrüse und Enddarm in dem Verhältnis der Umsätze von Mannose/Glucose gefunden ($P < 0,05$). (Tab.3 und 4).

Die Spezifitätsuntersuchungen am Rohextrakt lassen also noch keinen Schluß auf die Existenz von verschiedenen Hexokinasen zu. Die Versuche zeigen aber, daß in den Organen des Flußkrebsses eine hohe Aktivität ge-

		Antennendrüse	Enddarm	Herz	F	P
Glucose	Spez. Akt. [nMol/mg Protein·min] Spez. Akt. [μMol/g Frischgew.·h] relative Rate Anzahl der Messungen	128,8 ± 15,7 307,8 ± 43,2 1,00 6	121,6 ± 25,9 296,4 ± 51,0 1,00 6	82,0 ± 32,9 190,8 ± 68,4 1,00 6		
Mannose	Spez. Akt. [nMol/mg Protein·min] Spez. Akt. [μMol/g Frischgew.·h] relative Rate Anzahl der Messungen	189,2 ± 36,8 440,4 ± 72,0 1,48 5	95,8 ± 44,1 244,2 ± 99,0 0,85 4	92,8 ± 48,0 225,0 ± 129,6 1,09 5	4,754	0,05 u. 0,01
Galaktose	Spez. Akt. [nMol/mg Protein·min] Spez. Akt. [μMol/g Frischgew.·h] relative Rate Anzahl der Messungen	23,6 ± 17,3 59,5 ± 45,0 0,19 5	47,1 ± 23,4 109,8 ± 51,0 0,36 5	27,3 ± 17,5 69,0 ± 62,4 0,35 4	1,455	0,05
Fructose	Spez. Akt. [nMol/mg Protein·min] Spez. Akt. [μMol/g Frischgew.·h] relative Rate Anzahl der Messungen	58,7 ± 18,4 134,4 ± 26,4 0,44 5	63,8 ± 29,6 147,0 ± 65,4 0,50 5	53,4 ± 50,8 121,2 ± 106,2 0,51 5	0,139	0,05
Glucosamin	Spez. Akt. [nMol/mg Protein·min] Spez. Akt. [μMol/g Frischgew.·h] relative Rate Anzahl der Messungen	45,2 ± 9,7 106,2 ± 25,8 0,36 5	97,0 ± 30,3 243,0 ± 102,6 0,74 4	47,4 ± 16,9 105,0 ± 28,8 0,67 5	3,703	0,05
2-Desoxy-Glucose	Spez. Akt. [nMol/mg Protein·min] Spez. Akt. [μMol/g Frischgew.·h] relative Rate Anzahl der Messungen	138,0 ± 27,2 351,0 ± 81,0 1,09 4	109,0 ± 20,6 271,2 ± 54,6 1,03 4	80,1 ± 42,8 198,6 ± 117,6 1,12 4	0,074	0,05

Tab. 3:

Spezifische Aktivitäten gegenüber 6 Zuckern und relative Umsatzraten bezogen auf Glucose im Rohextrakt von Antennendrüse, Enddarm und Herz

Die Werte für die relative Umsatzrate sind ebenfalls Mittelwerte aus der angegebenen Anzahl der Messungen.

genüber Mannose besteht, während bei den meisten Hexokinasen der Umsatz von Glucose stärker ist als der von Mannose.

Organe	t	P
Antennendrüse gegen Enddarm	3,021	0,012
Antennendrüse gegen Herz	1,984	0,07
Enddarm gegen Herz	1,150	0,28

Tab.4: t-Test für das Verhältnis von Mannose-/Glucoseumsatz in den drei Rohextrakten

2. Fraktionierung

a) Ammoniumsulfat-Fällung

Eine Reinigung der Hexokinase wurde mit Hilfe der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung versucht. Die Fraktionierung wurde am Rohextrakt der Antennendrüse (1-2 mg Protein/ml) vorgenommen. Die Niederschläge zwischen 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% und 80-100% Sättigung an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ wurden getrennt untersucht. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im optischen Test mit Glucose als Substrat.

Konzentration an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [%]	Gesamtaktivität gegenüber Glucose [nMol/min]	spez. Aktivität gegenüber Glucose [nMol/mg Protein · min]	Ausbeute [%]	Anreicherung
0	39 240	218,0	100	—
20	1 107	316,0	2,8	1,46
40	1 012	95,5	2,6	0,44
60	777	32,2	2,0	0,15
80	4 340	236,0	11,0	1,08
100	288	575,0	0,7	2,64

Tab.5: Ammoniumsulfat-Fällung am Rohextrakt der Antennendrüse.
Fällungen durch Zugabe von festem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Aus Tab.5 ist ersichtlich, daß mit dieser Methode keine nennenswerte Anreicherung des Enzyms in einer der Fraktionen erzielt werden konnte. Zum anderen scheint die Salzzugabe zu einer Inaktivierung des Enzyms zu führen, was aus der geringen Ausbeute ersichtlich ist. Eine Inaktivierung durch Salze zeigte sich ja auch schon bei Zugabe von NaCl zum Rohextrakt (s.S.30). KERLY u. LEABACK (1957) berichten ebenfalls von einer völligen Zerstörung der Hexokinase aus der Wanderheuschrecke Locusta migratoria bei dem Versuch einer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fraktionierung.

Die Reinigung mit Ammoniumsulfat wurde daher nach einigen ähnlich verlaufenden Fällungsversuchen nicht weiter durchgeführt.

b) Säulenchromatographie

Der Rohextrakt wurde ohne weitere Vorreinigung der Chromatographie an Ionenaustauschern und der Gelfiltration unterworfen. Nach Aktivitätsbestimmung mit dem Gemisch aus Glucose, Mannose und Fructose an den einzelnen Fraktionen wurden die hintereinanderliegenden aktiven Fraktionen vereinigt und auf ihre Aktivität gegen einzelne Zucker geprüft. Hierbei wurde ebenfalls Glucose, Mannose und Fructose verwendet. Die Aktivität mit Mannose wurde gleich 1 gesetzt, und die beiden anderen Aktivitäten wurden auf diesen Wert bezogen. In der Tab.6 sind diese relativen Zahlenwerte für die benutzten Ionenaustauscher zusammengestellt:

In Versuch 1 erfolgte die Chromatographie des Rohextraktes an DEAE-Cellulose. Es ergab sich eine Trennung in zwei aktive Fraktionen, von denen eine im Vorlauf (Fraktion I), die andere im NaCl-Gradienten (Fraktion II) erhalten wurde (s. auch Abb.8). Letztere wurde anschließend gleich an Sephadex G 25 entsalzt. Beide Fraktionen unterschieden sich in ihren Aktivitäten gegenüber den drei Zuckern.

In Versuch 2 wurde der Rohextrakt auf Sephadex G 100 aufgegeben und der Gelfiltration unterzogen. Es er-

Nr. des Versuchs	Rohextrakt	Sephadex G 100	Sephadex G 200	DEAE-Sephadex	CM-Cellulose	DEAE-Cellulose	
						Fraktion I	Fraktion II
1	1:0,65:0,28					1:0,05:0,13	1:0,72: -
2	1:0,54:0,29	1:0,61: -				1:0,02:0,25	1:1,20:0,41
3	1:0,55:0,17		1:0,62:0,16	1:0,63:0,22		1:0,00:0,18	1:0,88:0,49
4						1:0,01:0,22	1:0,99:0,69
5					1:0,69:0,22		
6	1:0,67:0,34						
Mittel	1:0,60:0,27	1:0,61: -	1:0,62:0,16	1:0,63:0,22	1:0,69:0,22	1:0,02:0,20	1:0,95:0,53

Tab.6: Relative Umsatzrate für Mannose, Glucose und Fructose bezogen auf Mannose in verschiedenen Enzympräparationen der Antennendrüse
Verhältniszahlen: Mannose:Glucose:Fructose
Umsatz von Mannose gleich 1 gesetzt.

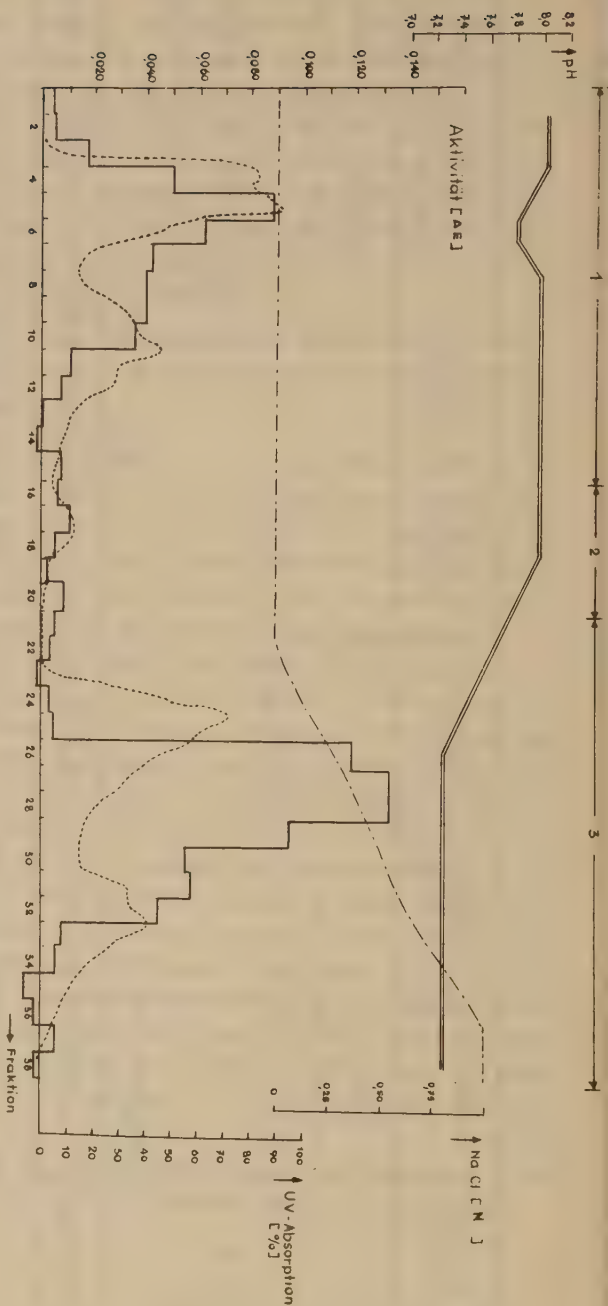


Abb. 8: Chromatographie des Rohextraktes von 20 Antennendrüsen an DEAE-Cellulose (Vers.Nr. 1 aus Tab. 6).

Säule 15 x 160 cm

Fraktion: 7 ml

— Aktivität, bestimmt mit einem Gemisch aus Glucose, Mannose, Fructose als Substrat

— Protein

— pH

--- NaCl-Konzentration

1 = Vorlauf: Tris-Puffer 50 mM + EDTA 5 mM pH 7,6

2 = kontinuierlicher linearer pH-Gradient: Tris-Acetat-Puffer 50 mM + EDTA 5 mM pH 6,3 gegen Puffer unter 1.

3 = kontinuierlicher linearer NaCl-Gradient: gepufferter NaCl-Lösung 1 M gegen Puffer unter 2.

gab sich, daß die gesamte Aktivität mit dem ersten Proteingipfel im Vorlauf ohne Auftrennung eluiert wurde. Die relative Phosphorylierung der drei Zucker entsprach den Werten am Rohextrakt. Die aktive Fraktion wurde nach Konzentrieren mit Sephadex G 25 coarse an DEAE-Cellulose chromatographiert. Es ergaben sich wieder die beiden Fraktionen I und II.

Versuch 3 zeigt die Gelfiltration des Rohextraktes an Sephadex G 200. Die gesamte Aktivität erschien wieder im Vorlauf mit dem ersten Proteingipfel - allerdings etwas später als in dem Versuch an Sephadex G 100 - und entsprach in der relativen Umsatzrate der drei Zucker dem Rohextrakt. Die aktive Fraktion wurde darauf an DEAE-Sephadex chromatographiert. Die Aktivität wurde ungetrennt im NaCl-Gradienten freigesetzt. Nach Entsalzung zeigte die relative Phosphorylierung der drei Zucker keinen Unterschied zum Ausgangsmaterial.

Die Versuche 4 und 5 zeigen weitere Chromatographien an DEAE-Cellulose, deren Ergebnisse mit denen der Versuche 1 und 2 übereinstimmen.

Bei Chromatographie an CM-Cellulose wurde die gesamte Aktivität ungetrennt im Vorlauf erhalten (Versuch 6). Das gleiche gilt für Hydroxylapatit-Cellulose.

Aus Tab.6 geht hervor, daß von allen benutzten Ionenaustauschern nur an DEAE-Cellulose eine Trennung der Hexokinaseaktivität in zwei aktive Fraktionen unterschiedlicher Spezifität erreicht werden konnte.

Um zu prüfen, ob die beiden Hexokinasen chromatographisch einheitlich sind, wurden Fraktion I und II jeweils getrennt im gleichen System an DEAE-Cellulose rechromatographiert (Abb.9). Die beiden Hexokinasen erschienen einheitlich an der erwarteten Stelle. Für die relative Umsatzrate mit Mannose, Glucose und Fructose ergab sich bei der Rechromatographie das auf S.41 schematisch dargestellte Bild. Auch hier findet sich also eine Übereinstimmung vor und nach der Rechromatographie.

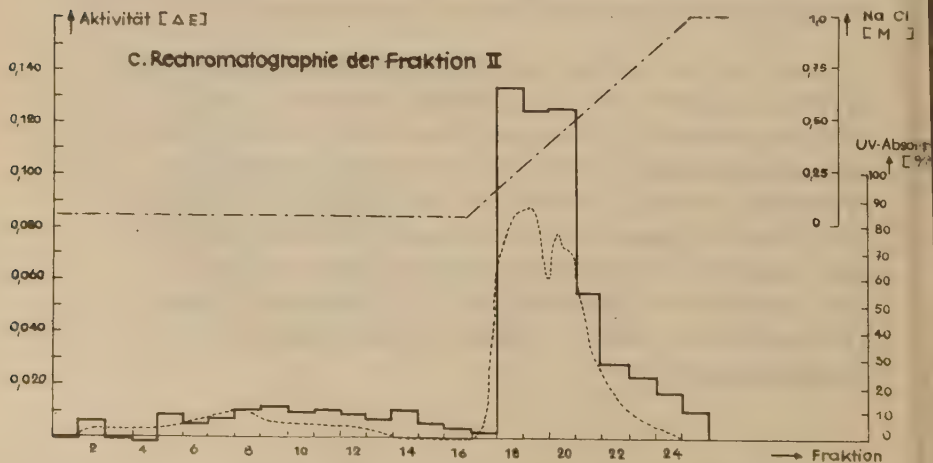
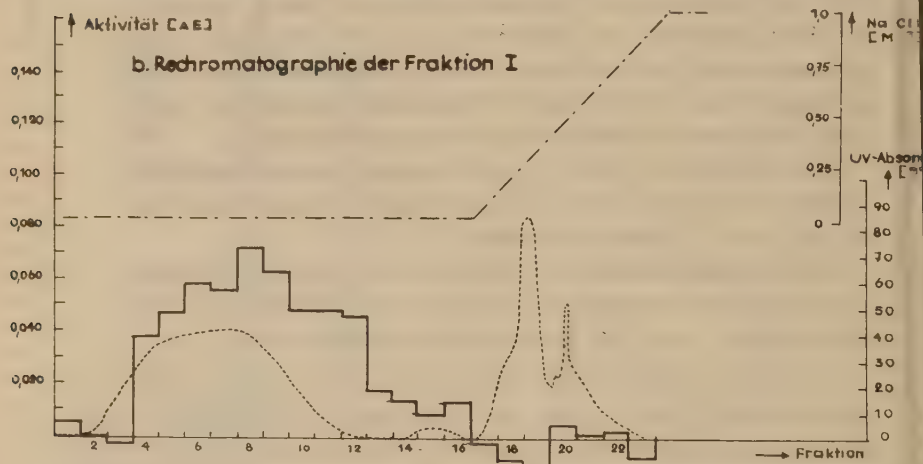
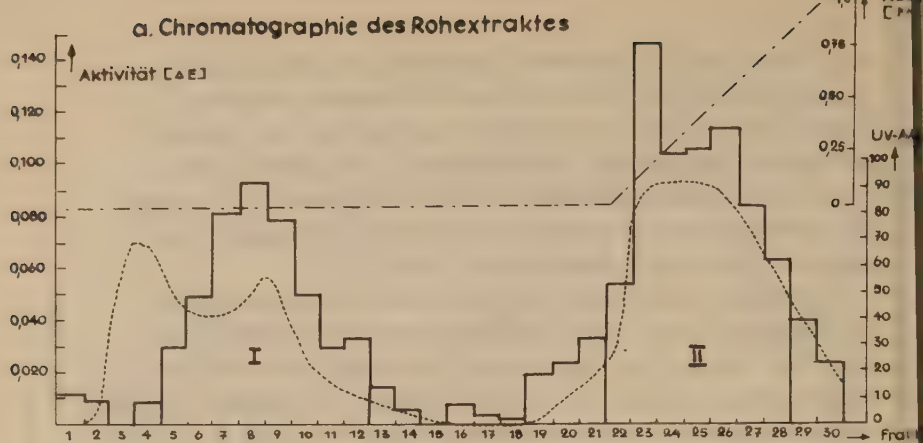


Abb. 9: Chromatographie des Rohextraktes der Antennendrüse an DEAE-Cellulose und Rechromatographie der aktiven Fraktionen im gleichen System.

— Protein — Aktivität -.-.- NaCl-Konzentration

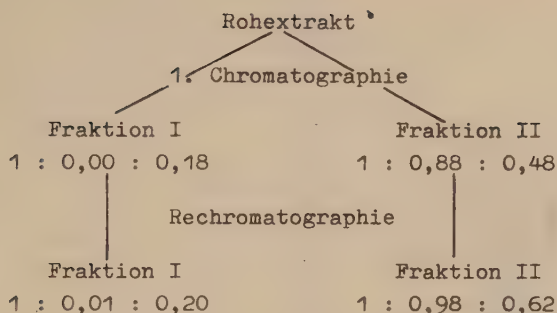


Abb. 10 und 11 zeigen die Chromatographien der Rohextrakte von Enddarm und Herz an DEAE-Cellulose. Hier findet man ebenfalls die beiden Hexokinaseaktivitäten wie in der Antennendrüse. Untersucht man den Umsatz von Mannose und Glucose durch die beiden Hexokinasen aus Enddarm und Herz, so entsprechen die relativen Umsatzraten der beiden Zucker denen der Enzyme aus der Antennendrüse (Tab.7). Die beiden Hexokinasen finden sich also in allen drei untersuchten Organen.

c) Elektrophorese

Es sollte untersucht werden, ob sich die beiden durch Chromatographie an DEAE-Cellulose gefundenen Aktivitäten durch ein anderes Trennverfahren, die Elektrophorese, noch weiter auftrennen ließen. In orientierenden Vorversuchen wurde käufliche Hefehexokinase (Fa. Boehringer/Mannheim), die an Sephadex G 25 entsalzt wurde, auf Agarplatten der Elektrophorese unterworfen. Es zeigte sich, daß nach 16 Stunden Elektrophorese das Protein 2 cm anodisch gewandert war (Abb.12a). Die Ausbeute bei Extraktion des Enzyms aus dem Gel betrug nur 7,5%. Bei der Elektrophorese der käuflichen Hefehexokinase an Polyacrylamidgel (Abb.12b) war die Ausbeute an aktivem Enzym etwas günstiger und betrug 14%. Ein weiterer Vorteil des Polyacrylamidgels war die kurze Dauer der Elektrophorese und die hohe Auflösung dieser Gele. Aus Abb.12b ersieht man, daß das Enzym in 5 Proteinbanden aufgelöst wird, die Hauptbande ist nach 60 Minu-

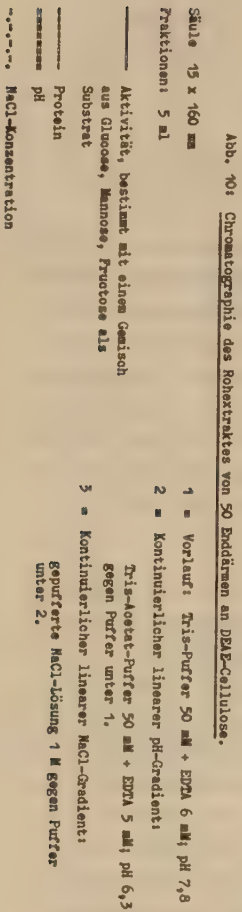


Abb. 10: Chromatographie des Rohextraktes von 50 Enddärmen an DEAE-Cellulose.

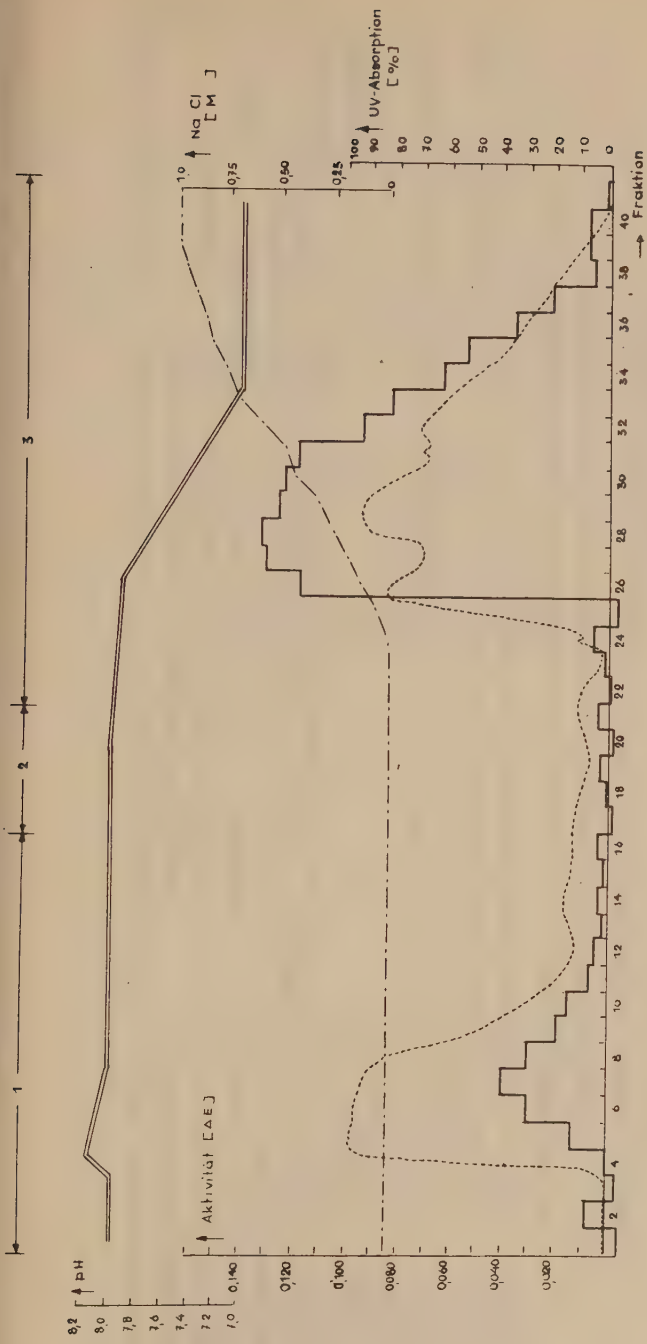


Abb. 11: Chromatographie des Rohextraktes von 50 Herzen an DEAE-Cellulose.

Säule 15 x 160 mm

Fractionen: 5 ml

— Aktivität, bestimmt mit einem Gemisch aus Glucose, Mannose, Fructose als Substrat

..... Protein

----- pH

- - - - - NaCl-Konzentration

- 1 = Vorlauf: Tris-Puffer 50 mM + EDTA 5 mM; pH 7,8
- 2 = Kontinuierlicher linearer pH-Gradient: Tris-Acetat-Puffer 50 mM + EDTA 5 mM, pH 6,3 gegen Puffer unter 1.
- 3 = Kontinuierlicher linearer NaCl-Gradient: gepufferte NaCl-Lösung 1 M gegen Puffer unter 2.

Organ	spezifische Aktivität [μ Mol/mg Protein.min]						Relative Rate Mannose:Glucose		
	Roheextrakt		Fraktion I		Fraktion II		Roheextrakt	Fraktion I	Fraktion II
	Mannose	Glucose	Mannose	Glucose	Mannose	Glucose			
Antennen- drüse							1 : 0,60	1 : 0,02	1 : 0,95
Enddarm	97,8 $\pm$ 1,9	50,4 $\pm$ 1,9	28,5 $\pm$ 4,2	0	62,7 $\pm$ 1,5	56,3 $\pm$ 1,6	1 : 0,52	1 : 0	1 : 0,90
Herz	89,0 $\pm$ 4,9	57,3 $\pm$ 8,2	28,8 $\pm$ 3,9	0,63 $\pm$ 2,7	58,1 $\pm$ 2,5	50,4 $\pm$ 2,0	1 : 0,64	1 : 0,02	1 : 0,87

Tab.7: Relative Umsatzrate für Glucose und Mannose in den beiden Fraktionen der

DEAE-Cellulose-Chromatographie für die drei untersuchten Organe

Die Werte für die Antennendrüse stellen die Mittelwerte aus vier Chromatographien dar (s.Tab.6).

Für die übrigen Werte wurden jeweils drei Aktivitätsbestimmungen am gleichen Extrakt ausgeführt.

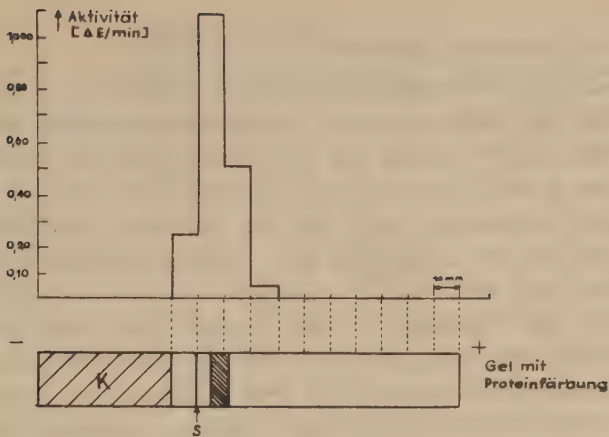


Abb. 12 a: Elektrophorese von käuflicher entsalzter Hefe-Hexokinase an 1 %-igem Agarosegel.

800 V, 16 h

Färbung auf Protein mit Amidoschwarz 10 B und Aktivitätsbestimmung im optischen Test mit Glucose als Substrat nach Extraktion des Enzyms aus dem Gel. (Ausbeute 7,5 %).

K = Kathodenteil aus Hyflo-Supercel

S = Startpunkt

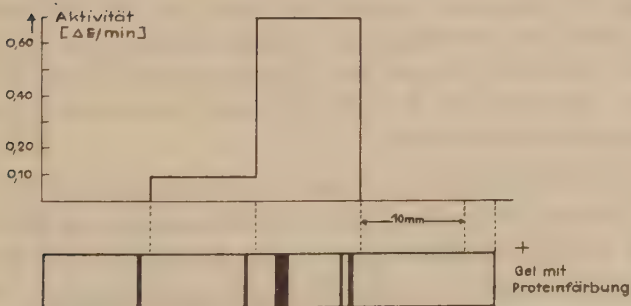


Abb. 12 b: Elektrophorese von käuflicher entsalzter Hefe-Hexokinase an Polysacrylamidgel.

200 V, 60 min

Färbung auf Protein mit Amidoschwarz 10 B und Aktivitätsbestimmung im optischen Test mit Glucose als Substrat nach Extraktion des Enzyms aus dem Gel. (Ausbeute 14 %).

ten 22 mm anodisch gewandert.

Proben des Rohextraktes, sowie der Fraktionen I und II wurden der Elektrophorese an Polyacrylamidgel unterworfen. Abb. 13 zeigt die auf Protein angefärbten Gele. Man sieht, daß ein Teil der Proteine, die im Rohextrakt vorhanden sind, bei den aktiven Fraktionen fehlt und daß bei letzteren neue Banden vorhanden sind. Letzteres läßt sich daraus erklären, daß im Rohextrakt gegenüber den Fraktionen I und II sehr viel mehr Proteine vorhanden sind, die sich bei der Wanderung im elektrischen Feld gegenseitig beeinflussen und daher nicht so weitgehend aufgetrennt werden. Weiterhin zeigen sich starke Unterschiede im Proteinspektrum der beiden aktiven Fraktionen. Gleichzeitig sieht man, daß die Fraktionen bei weitem keine hochgereinigten Enzympräparationen darstellen, sondern daß es sich bei beiden um ein Proteingemisch handelt. Das war nach der Chromatographie des ungereinigten Rohextraktes auch zu erwarten.

Für beide Fraktionen wurde versucht, die Aktivität aus dem Gel zu extrahieren und mit dem Zuckergemisch als Substrat nachzuweisen. Für Fraktion II erhielt man hierbei einen Aktivitätsgipfel (Abb. 14). Allerdings betrug die Ausbeute an aktivem Enzym nur 6%. Es könnte also noch eine Trennung in mehrere Gipfel erfolgt sein, deren Aktivität während der Elektrophorese zerstört wurde. Bei Fraktion I ließ sich kein aktives Enzym mehr aus dem Gel extrahieren.

Bei Verwendung von pH 6,6-gel, einem Gel, das bei niedrigerem pH trennt als das Standardgel, war die Ausbeute an aktivem Enzym auch nicht günstiger. Die Elektrophorese eignete sich also nicht sonderlich zur weiteren Reinigung der Fraktionen I und II. Sie erbrachte keinen Hinweis auf das Vorliegen mehrerer Enzyme in der Fraktion II.

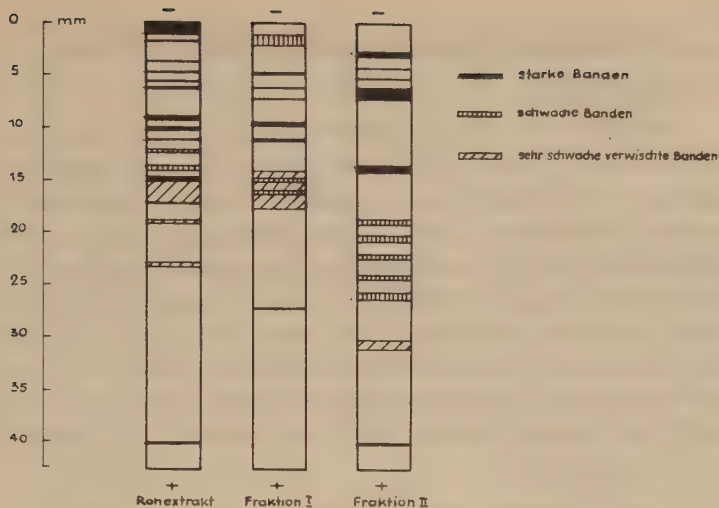


Abb. 13: Elektrophorese des Rohextraktes und der Fraktion I und II an Polyacrylamidgel.

200 V, 65 min

Färbung auf Protein mit Amidoschwarz 10 B

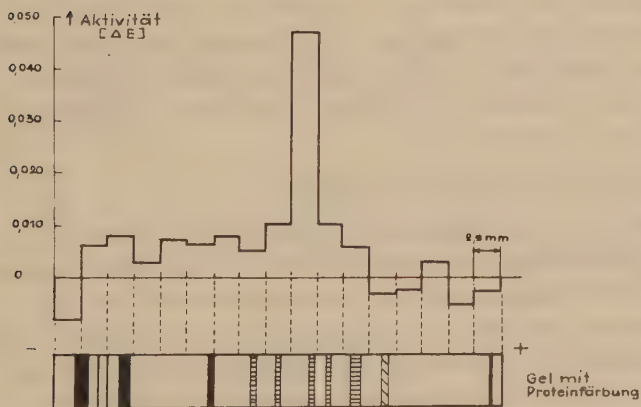


Abb. 14: Elektrophorese der Fraktion II an Polyacrylamidgel.

200 V, 60 min

Färbung auf Protein mit Amidoschwarz 10 B und Aktivitätsbestimmung mit einem Gemisch aus Glucose, Mannose, Fruktose als Substrat nach Extraktion des Enzyms aus dem Gel

(Ausbeute 6 %)

3. Charakterisierung der beiden Enzymaktivitäten.

a) Spezifität

Es sollte der Umsatz von 10 Zuckern, darunter einer Pentose, durch die beiden Hexokinasen untersucht werden. Hierzu wurde der Rohextrakt aus 92 Antennendrüsen an DEAE-Cellulose chromatographiert und beide Fraktionen im gleichen System rechromatographiert. Nach Entsalzung der Fraktion II wurde gleich anschließend an beiden Fraktionen die Aktivität gegen die 10 Zucker über den Zuckerverbrauch bestimmt. Die Inkubationsdauer betrug 30 Minuten, da die Extrakte ziemlich verdünnt waren. Für jeden Zucker erfolgten vier Bestimmungen.

In Tab.8 sind die spezifischen Aktivitäten beider Fraktionen für die einzelnen Zucker zusammengestellt. Die Aktivität gegenüber Mannose wurde gleich 1 gesetzt und die Phosphorylierung der übrigen Zucker darauf bezogen. Mit Hilfe des t-Testes wurde ermittelt, welche Aktivitätswerte signifikant von Null verschieden sind ($P < 0,01$). Die Fraktion I ist nur aktiv mit Mannose und Fructose. Mannose als Substrat wird sehr viel stärker umgesetzt als Fructose. Die übrigen acht Zucker werden nicht phosphoryliert. Für Fraktion II sind sechs der zehn getesteten Zucker Substrate. Umgesetzt werden Glucose, Mannose, Fructose, Glucosamin, 2-Desoxyglucose und Galaktosamin.

b) Endprodukte der Phosphorylierung

Die Natur der Zuckerphosphate wurde mit Hilfe der Papierchromatographie untersucht (s.S.25). Abb.15 zeigt die Papierchromatogramme der Inkubationsgemische der beiden Fraktionen der Antennendrüse. Als Substrate dienten wiederum die 10 Zucker, mit denen die Untersuchungen zur Spezifität durchgeführt wurden. Es ergab sich, daß alle Zucker, die als Substrate dienen, von beiden Enzymen in C-6-Stellung phosphoryliert werden.

c) Bestimmung der Michaeliskonstanten

Die Geschwindigkeit einer Enzymreaktion ist abhängig

Zucker	F R A K T I O N I			F R A K T I O N II		
	Spez. Aktivität [nMol/mg Protein.] min	Relative Rate (bezogen auf Mannose)	P	Spez. Aktivität [nMol/mg Protein.] min	Relative Rate (bezogen auf Mannose)	P
Mannose	447,0 ± 19,8	<u>1,00</u>	0,0002	123,0 ± 12,3	<u>1,00</u>	0,0002
Glucose	6,6 ± 26,8	0,01	0,5	122,0 ± 9,0	<u>0,99</u>	0,0002
Galaktose	29,2 ± 23,0	0,06	0,095	5,4 ± 10,8	0,04	0,084
Fructose	99,1 ± 23,0	<u>0,22</u>	0,003	84,5 ± 11,0	<u>0,69</u>	0,0002
Glucosamin	16,6 ± 33,0	0,04	0,3	78,0 ± 15,0	<u>0,63</u>	0,00024
N-Acetyl- glucosamin	-23,1 ± 15,0	-0,05	0,052	1,4 ± 2,8	0,01	0,33
2-Desoxy- glucose	20,7 ± 37,0	0,05	0,135	114,0 ± 14,5	<u>0,93</u>	0,0002
Fucose	11,4 ± 34,0	0,03	0,17	2,1 ± 10,0	0,02	0,21
Galaktosamin	25,6 ± 28,0	0,06	0,14	27,5 ± 9,0	<u>0,22</u>	0,0013
Ribose	24,9 ± 30,0	0,06	0,205	18,0 ± 9,0	0,15	0,045

Tab.8: Spezifität der Fraktionen I und II gegenüber 10 Zuckern (Antennendrüse)
Anzahl der Messungen je Zucker: n = 4
Die unterstrichenen Werte sind signifikant von Null verschieden ($P < 0,01$)

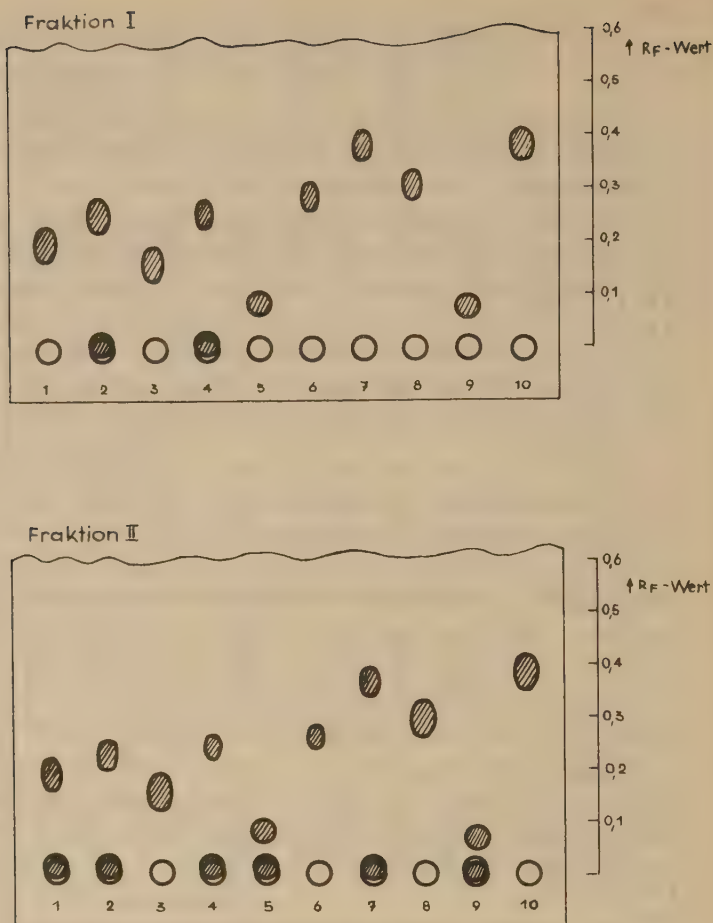


Abb. 15: Papierchromatogramme der Inkubationsgemische
von Fraktion I und Fraktion II zur Identifizierung
der Endprodukte der Phosphorylierung.

Bei der Inkubation eingesetztes Substrat:

- | | |
|--------------|----------------------|
| 1 Glucose | 6 N-Acetylglucosamin |
| 2 Mannose | 7 2-Desoxyglucose |
| 3 Galaktose | 8 Fucose |
| 4 Fructose | 9 Galaktosamin |
| 5 Glucosamin | 10 Ribose |

Laufmittel: Äthylacetat - Pyridin - Wasser
 10 : 4 : 3

Entwicklung: 1. $\text{FeCl}_3 - \text{K}_4 \text{Fe}(\text{CN})_6$

2. Anilinphthalat

- anorganisches Phosphat u.s. Phosphate
 ● freie Zucker und Zucker-6-Phosphate

von der Konzentration des Substrates. MICHAELIS u. MENTEN (1913)¹⁾ fanden für diese Abhängigkeit die Gleichung:

$$v = V \cdot \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

v = Geschwindigkeit bei der Substratkonzentration $[S]$

V = theoretische Maximalgeschwindigkeit

K_m = Michaeliskonstante $[M]$

Die Michaeliskonstante ist gleich der Substratkonzentration, bei der halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht ist. Zur Charakterisierung von Enzymen bestimmt man diese Konstante, die für jedes Substrat verschieden sein kann. Eine hohe Michaeliskonstante bedeutet, daß das Enzym für das betreffende Substrat eine geringe Affinität besitzt und umgekehrt.

Zur Bestimmung der Michaeliskonstanten wird die obige Gleichung in eine Geradengleichung umgeformt. Hier wurde die Gleichung nach LINEWEAVER u. BURK (1934)¹⁾ verwendet:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{[S]}$$

Im Koordinatensystem $\frac{1}{v}$ gegen $\frac{1}{[S]}$ ergibt sich beim Auftragen der gemessenen Werte von v eine Gerade, deren Durchgang durch die Abzisse gleich $-\frac{1}{K_m}$ ist.

Für die beiden Enzymaktivitäten wurde die Reaktionsgeschwindigkeit im optischen Test (s.S.15 ff) bei 6 bis 8 verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt. Bei Fraktion I dienten Mannose und Fructose als Substrat, bei Fraktion II wurde außerdem noch eine Bestimmung für Glucose durchgeführt. In Abb.16 sind die gemessenen Werte im graphischen Verfahren ausgewertet. Da die Bestimmungen mit den einzelnen Substraten nicht alle am gleichen Tag erfolgten, kann man die Werte der Maximalgeschwindigkeiten eines Enzyms mit den verschiedenen Substraten nicht direkt vergleichen, da die Aktivität der Präparationen während der Lagerung abnahm (s.auch Abb.7). Die Michaeliskonstanten für die ge-

¹⁾ zit. nach NETTER (1959)

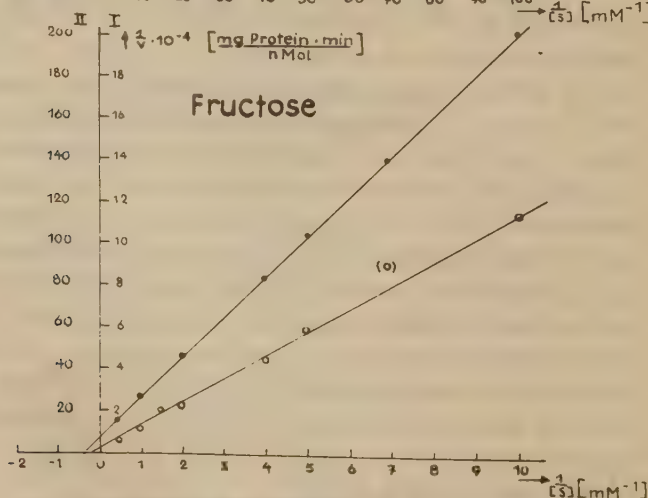
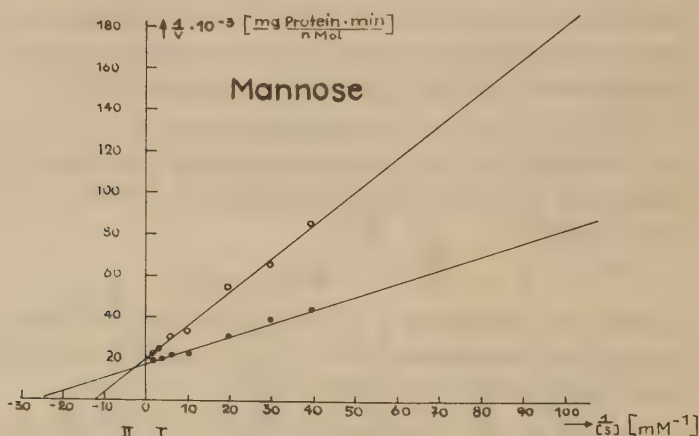
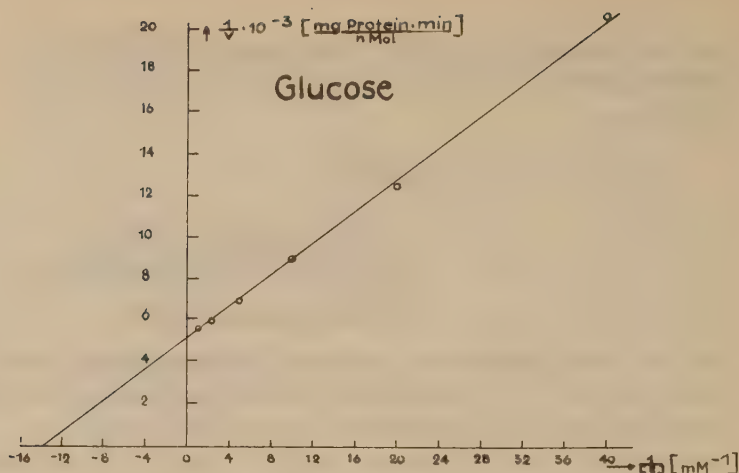


Abb. 16: Bestimmung der Michaeliskonstanten für Glucose, Mannose, Fructose an Fraktion I und II im graphischen Verfahren nach LINEWEAVER-BURK.

● — Fraktion I ○ — Fraktion II

testeten Substrate ergaben sich zu folgenden Werten:

Substrat	Michaeliskonstante [M]	
	Fraktion I	Fraktion II
Glucose	-	$7,1 \cdot 10^{-5}$
Mannose	$3,9 \cdot 10^{-5}$	$8,0 \cdot 10^{-5}$
Fructose	$2,9 \cdot 10^{-3}$	$6,7 \cdot 10^{-3}$

Tab.9: Michaeliskonstanten der Fraktionen I und II der Antennendrüse für drei Substrate

Auf eine statistische Prüfung hinsichtlich der Unterschiede der Michaeliskonstanten beider Enzyme für das gleiche Substrat wurde verzichtet. Die geringe Streuung der Meßpunkte gestattet vielleicht die Aussage, daß sich die Michaeliskonstanten beider Enzyme für Mannose und eventuell auch für Fructose voneinander unterscheiden. Größenordnungsmäßig entsprechen sich aber die Konstanten beider Enzyme für das jeweilige Substrat.

D i s k u s s i o n u n d v e r g l e i c h e n d e B e t r a c h t u n g

Es sollte untersucht werden, ob die Hexokinaseaktivität in den Organen des Flußkrebsses auf dem Vorhandensein eines oder mehrerer Enzyme beruht. Mit Hilfe der Spezifitätsuntersuchungen am Rohextrakt ließ sich diese Frage nicht klären, da die Unterschiede in der Phosphorylierung beträchtlich waren (s.Tab.3). Ähnliche Schwankungen in der relativen Umsatzrate verschiedener Zucker wurden auch von KERLY u. LEABACK (1957) bei Versuchen mit Rohhomogenaten des Muskels der Wanderheuschrecke Locusta migratoria beobachtet. Eine Erklärung für diese Unterschiede zwischen den einzelnen Homogenaten sehen die Autoren in nicht kontrollierbaren Einflüssen auf die Hexosephosphorylierung im Rohhomogenat. Dies dürfte wohl auch für die hier angeführten Versuche am Rohextrakt gelten.

Aus den Versuchen am Rohextrakt kann man aber entnehmen, daß Mannose am stärksten umgesetzt wird. Eine bevorzugte Phosphorylierung der Mannose durch Homogenate des Fettgewebes der Ratte beschreiben HERNÁNDEZ u. SOLS (1963). Hier handelt es sich um eine unspezifische Hexokinase, deren Substratspezifität ansonsten weitgehend mit der der Gehirnhexokinase übereinstimmt. Die höchste Enzymaktivität mit Mannose als Substrat wurde weiterhin in den Eiern des Seeigels Arbacia punctulata (KRAHL u.a. 1954) und in Rohhomogenaten der Honigbiene (SOLS u.a. 1960) nachgewiesen. Da in den Homogenaten der Biene fast keine Phosphomannoseisomeraseaktivität nachgewiesen werden konnte, erklären SOLS u. Mitarb. die Giftigkeit der Mannose für Honigbienen folgendermaßen: Durch die rasche Phosphorylierung der Mannose kommt es zu einer Anhäufung von Mannose-6-Phosphat in der Zelle, das wegen des Fehlens der Isomerase im Stoffwechsel nicht weiter verarbeitet werden kann.

Die Verteilung der Hexokinaseaktivität der Orconectes-Organen in der Zelle entspricht völlig dem häufig

beschriebenen Typ der cytoplasmatischen Hexokinase.

Das breite pH-Optimum kennt man ebenfalls von vielen Hexokinasen. So hat z.B. die Hefehexokinase ein pH-Optimum von 5 - 9 (SOLS u.a. 1958), die Leberfructokinase von 6 - 8 (HERS 1952), das Enzym aus Aspergillus parasiticus von 7 - 9 (DAVIDSON 1960) und die Hexokinase aus Locusta migratoria bei und über 7,9. Letzteres gilt auch für das Enzym der Honigbiene (RUIZ-AMIL 1962). Die höchste Aktivität der Enzyme aus Orconectes limosus bei einem pH über 7,7 entspricht also insbesondere dem pH-Optimum der beiden hier genannten Hexokinasen aus "Wirbellosen".

Die recht hohe Instabilität der Hexokinasen des Flußkrebsses ist auch von manchen anderen Hexokinasen bekannt. So scheiterten Reinigungsversuche der Enzyme aus Locusta migratoria, aus der Retina der Ratte (HOARE u. KERLY 1954) und aus Rattenmuskel (WALAAS u. WALAAS 1962) wegen der raschen Inaktivierung der Hexokinasen. Sehr labil zeigten sich auch die Aktivitäten in Homogenaten der Rattenmucosa (SOLS 1956) und von Spirochaeta recurrentis (SMITH 1960).

Die Frage nach dem Vorhandensein mehrerer Hexokinasen ließ sich mit Hilfe der Chromatographie an DEAE-Cellulose klären. Die drei untersuchten Organe enthalten mindestens zwei Hexokinasen unterschiedlicher Spezifität. Die eine von ihnen, als Fraktion II bezeichnet, kann man als unspezifische Hexokinase bezeichnen. Sie setzt die gleichen Zucker um, die auch von anderen unspezifischen Hexokinasen phosphoryliert werden. Tab.10 zeigt für einige Hexokinasen eine Zusammenstellung der relativen Umsatzraten der Zucker, die in der vorliegenden Arbeit als Substrate getestet wurden. Es ist ersichtlich, daß die Spezifität der Fraktion II mit derjenigen der hier aufgeführten Enzyme weitgehend übereinstimmt. Der Umsatz von Fructose ist allerdings mit Ausnahme des Enzyms aus Spirochaeta recurrentis niedriger als bei den übrigen

Enzymquelle								
Zucker ⁺	Gehirn (Kalb)	Mucosa (Ratte)	Fettgewebe (Ratte)	Hefe	Honig- biene	Eier des Seelgels <i>Arbacia punctulata</i>	<i>Spirochaeta recurrentis</i>	<i>Orconectes limosus</i> Fraktion II
Glucose	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Mannose	0,4	0,75	1,6	0,8	0,6	1,2	0,95	1,01
Galaktose	0,02	0,05	0,05	0,002	0,001	0,0	0,02	0,04
Fructose	1,5	1,2	1,5	1,8	2,7	1,8	0,29	0,69
Glucosamin	0,6	0,75	0,7	0,7	0,8	0,6	0,0	0,64
N-Acetyl- Glucosamin	0	0,05	0,05	0,001	0,001			0,01
2-Desoxy- Glucose	1,0	0,90	1,5	1,0	1,3	2,0		0,93
Fucose								0,02
Galaktosamin								0,22
Ribose	0	0,05						0,15
Literatur	(5)	(4)	(1)	(6)	(7)	(2)	(3)	

Tab.10: Substratspezifität einiger Hexokinasen

⁺Es wurden hier nur diejenigen Zucker tabelliert, die für die Orconectes-Enzyme als Substrate getestet wurden. In den Originalarbeiten finden sich teilweise weitere getestete Zucker.

Hexokinasen, die Fructose immer stärker umsetzen als Glucose. Die Übereinstimmung mit anderen unspezifischen Hexokinasen zeigt sich auch in der Natur der Endprodukte der Phosphorylierung. Alle Zucker werden in C-6-Stellung phosphoryliert, wie dies auch für unspezifische tierische und pflanzliche Hexokinasen gilt. Es besteht natürlich noch die Möglichkeit, daß sich die Aktivität der hier als Fraktion II beschriebenen Hexokinase aus den Aktivitäten mehrerer Enzyme zusammensetzt, deren Trennung nicht gelungen ist. Nach dem chromatographischen und elektrophoretischen Verhalten und der weitgehenden Übereinstimmung ihrer Eigenschaften mit bekannten Hexokinasen ist es aber sehr wahrscheinlich, daß es sich um die weitverbreitete Form der unspezifischen Hexokinase handelt.

Das zweite isolierte Enzym, die Fraktion I, setzt von den untersuchten Zuckern nur Mannose und Fructose um und zwar Mannose sehr viel stärker. Nach dem auf S.3 gewählten groben Ordnungsprinzip dürfte man dieses Enzym wohl zu den spezifischen Hexokinasen rechnen, da es bevorzugt einen Zucker phosphoryliert. Daß außerdem noch eine Aktivität mit Fructose besteht, würde hierbei nicht stören, da fast alle als spezifische Hexokinasen beschriebenen Enzyme nicht nur einen Zucker umsetzen. Eine Ausnahme bilden hier die vier streng spezifischen Enzyme des Hundebandwurms und des Pärchenegels, an denen fünf Zucker als Substrate getestet wurden (s.S.8). Tab.11 gibt eine Übersicht über einige als spezifische Hexokinasen beschriebene Enzyme. Man sieht, daß neben dem Hauptsubstrat auch geringere Aktivitäten mit anderen Zuckern gefunden wurden. Die als Fraktion I bezeichnete Hexokinase aus Orconectes limosus paßt sich ohne Schwierigkeiten in diese Tabelle ein.

Literatur zu Tab.10: (1) HERNÁNDEZ u. SOLS 1963; (2) KRAHL u.a. 1954; (3) SMITH 1960; (4) SOLS 1956; (5) SOLS u. CRANE 1954; (6) SOLS u.a. 1958; (7) RUIZ-AMIL 1962.

Enzym	Lit.	Zucker ⁺	rel. Rate
Galaktokinase aus <u>Saccharo- myces fragilis</u>	(1)	Galaktose	1,0
		Galaktosamin	0,4
		2-Desoxyga- laktose	0,4
		Talose	0,1
Fructo-1-ki- nase der Mu- cosa (Ratte)	(2)	Fructose Sorbitose	1,0 0,5
Fructo-6-ki- nase aus Erbsen	(3)	Fructose	1,0
		Sedoheptulose	0,2
		Glucose	0,08
		Mannose	0,06
Fraktion I aus <u>Orconectes limosus</u>		Mannose	1,0
		Fructose	0,22

Tab.11: Spezifitätsmuster einiger spezifischer Hexokinasen

⁺Es sind hier nur die Zucker tabelliert, die als Substrate dienen. Die Umsatzrate des Hauptsubstrates wurde gleich 1 gesetzt.

Literatur zu Tab.11: (1) ALVARADO 1960; (2) CADENAS u. SOLS 1960; (3) MEDINA u. SOLS 1956.

Aus dem Vorliegen dieser Hexokinase erklärt sich die hohe Umsatzrate für Mannose im Rohextrakt, welche eine Ähnlichkeit mit den auf S. 54 angeführten unspezifischen Hexokinasen vortäuschte, die Mannose am schnellsten phosphorylieren. Vielleicht ließen sich auch die Unterschiede in der relativen Umsatzrate von Glucose:Mannose im Rohhomogenat und im gereinigten Enzymextrakt der Honigbiene durch das Vorliegen mehrerer Hexokinasen erklären. SOLS u. Mitarb. (1960) fanden nämlich für die relative Umsatzrate Glucose:Mannose im Rohhomogenat der Honigbiene einen Wert von 1:1,86. Dagegen konnte RUIZ-AMIL (1962) bei der durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung teilweise gereinigten Hexokinase diese hohe Aktivität gegenüber Mannose nicht mehr nachweisen. Die relative

Umsatzrate Glucose:Mannose betrug hier nur 1:0,6. Eine umfassende Erklärung für diese Unterschiedlichkeit der Glucose/Mannose-Phosphorylierung im Rohhomogenat und am gereinigten Enzym findet der Autor nicht. Die Reinigung könnte hier vielleicht zur Abtrennung einer zweiten Hexokinaseaktivität mit hohem Umsatz der Mannose geführt haben.

Die Möglichkeit, daß auch bei Fraktion I ein Gemisch aus zwei spezifischen Enzymen vorliegt, ist natürlich nicht ganz von der Hand zu weisen. Eine Fructokinase in der Art, wie sie in der Leber der Säugetiere vorliegt, dürfte nicht vorhanden sein, da das Reaktionsprodukt für beide Substrate ein Zucker-6-Phosphat ist, während das Enzym der Leber in C-1-Stellung phosphoryliert. Auf Grund ihres chromatographischen Verhaltens ist die Fraktion I jedenfalls einheitlich. Leider war der Versuch, die Einheitlichkeit durch Elektrophoreseversuche zu überprüfen, erfolglos.

Enzymquelle	Lit.	Michaeliskonstante [M]		
		Glucose	Mannose	Fructose
Gehirn (Kalb)	(4)	$8,0 \cdot 10^{-6}$	$5,0 \cdot 10^{-6}$	$1,6 \cdot 10^{-3}$
Fettgewebe (Ratte)	(1)	$3,0 \cdot 10^{-5}$	$5,0 \cdot 10^{-5}$	$3,0 \cdot 10^{-3}$
Hefe	(5)	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$5,0 \cdot 10^{-5}$	$7,0 \cdot 10^{-4}$
Honigbiene	(6)	$4,0 \cdot 10^{-5}$	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$3,0 \cdot 10^{-3}$
Eier des Seeigels <u>Arbacia punctulata</u>	(2)	$3,0 \cdot 10^{-5}$	$7,0 \cdot 10^{-5}$	$7,5 \cdot 10^{-4}$
Krebs-Ascites- Tumorzellen	(3)	$2,8 \cdot 10^{-5}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-3}$
Fraktion I aus <u>Orconectes limosus</u>			$3,9 \cdot 10^{-5}$	$2,9 \cdot 10^{-3}$
Fraktion II aus <u>Orconectes limosus</u>		$7,1 \cdot 10^{-5}$	$8,0 \cdot 10^{-5}$	$6,7 \cdot 10^{-3}$

Tab.12: Michaeliskonstanten einiger Hexokinasen für Glucose, Mannose und Fructose.

Literatur zu Tab.12: (1) HERNÁNDEZ u. SOLS 1963; (2) KRAHL u.a. 1954; (3) MCCOMB u. YUSHOK 1959; (4) SOLS u. CRANE 1954; (5) SOLS u.a. 1958; (6) RUIZ-AMIL 1962.

In den Michaeliskonstanten für die drei untersuchten Zucker unterscheiden sich die beiden Hexokinasen nicht wesentlich voneinander. In Tab.12 sind die Michaeliskonstanten einiger unspezifischer Hexokinasen für Glucose, Mannose und Fructose zusammengestellt. Man sieht, daß die Konstanten größenordnungsmäßig eine gute Übereinstimmung zeigen. Lediglich die Gehirn- und Hefehexokinase zeigen einige Abweichungen. Im allgemeinen läßt sich aber sagen, daß die Konstanten für Glucose und Mannose immer um zwei Zehnerpotenzen kleiner sind als für Fructose. Die Affinität der Enzyme für Fructose ist also geringer. Das gleiche gilt für beide Hexokinasen des Flußkrebsses. Die Michaeliskonstanten für spezifische Hexokinasen in der Literatur liegen ebenfalls mit Ausnahme der Glucokinase der Säugerleber in der gleichen Größenordnung. So beträgt z.B. für die Fructo-1-kinase der Leber $K_m(\text{Fructose}) < 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (HERS 1952), für die Galaktokinase aus Saccharomyces fragilis ist $K_m(\text{Galaktose}) = 3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (ALVARADO 1960) und die Fructo-1-kinase der Mucosa hat eine K_m von $7 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (CADENAS u. SOLS 1960). Die Michaeliskonstanten der hochspezifischen Enzyme des Hundebandwurmes liegen ebenfalls zwischen $1 \cdot 10^{-4}$ und $6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (AGOSIN u. ARAVENA 1959). Die für die Fraktion I gefundenen Werte fügen sich also auch hier ohne weiteres ein.

Die beiden Hexokinasen finden sich in allen drei untersuchten Organen des Flußkrebsses. Stellt man einen Vergleich der Mengen an Fraktion I und II in den einzelnen Organen an, so ergibt sich das in Tab.13 zusammengefaßte Bild. Als Maß für die Menge an Enzym sind hier die Gesamtaktivitäten gegenüber Mannose in Fraktion I und II verglichen. Es zeigt sich, daß die Antennendrüse mehr spezifische Hexokinase besitzt als Enddarm und Herz. Das Mengenverhältnis in der Antennendrüse schwankt in den vier Versuchen. Dies könnte seinen Grund in der Instabilität der Enzyme haben. Aus Abb.4 war außerdem ersichtlich, daß die

Inaktivierung nicht immer gleich rasch erfolgte.

Organ	Gesamtaktivität [nMol/min]		Verhältnis Fraktion I: Fraktion II
	Fraktion I	Fraktion II	
Antennen- drüse	4261	2975	1 : 0,70
	4380	4420	1 : 1,01
	328	223	1 : 0,68
	3444	5040	1 : 1,46
Enddarm	248	2115	1 : 8,50
Herz	305	1848	1 : 6,05

Tab.13: Vergleich der Gesamtaktivität gegenüber Mannose zwischen Fraktion I und Fraktion II der Chromatographie an DEAE-Cellulose

Daß beide Enzympräparationen nicht immer im gleichen Maße inaktiviert werden, kann man aus Tab.14 entnehmen. Hier wurden die Gesamtaktivitäten gegenüber Glucose und Mannose vor und nach der Chromatographie an DEAE-Cellulose verglichen. Die Aktivität gegenüber Mannose nach der Chromatographie stellt die Summe der Gesamtaktivität gegenüber Mannose in Fraktion I und II dar. Es zeigt sich, daß die Ausbeute der beiden Aktivitäten nie ganz übereinstimmt und daß infolgedessen ebenfalls das Verhältnis der beiden Aktivitäten vor und nach der Chromatographie unterschiedlich ist. Dies dürfte nicht der Fall sein, wenn beide Fraktionen gleich schnell inaktiviert würden. Da in der Antennendrüse ein größerer Anteil der Gesamtaktivität auf die gegenüber Glucose inaktive Fraktion I entfällt als in Enddarm und Herz, sollte der Quotient Mannose:Glucose in Rohextrakten der Antennendrüse höher sein als in den beiden anderen Organen. Für den Vergleich der Antennendrüse mit dem Enddarm läßt sich dieser Unterschied statistisch nachweisen (s.S.33). Daß sich für den Vergleich der Antennendrüse mit dem

Organ	Gesamtaktivität [nMol/min]				Ausbeute [%]	Verhältnis Glucose : Mannose				
	Rohextrakt		Vorreinigung an Sephadex G 100			Rohextrakt		Vorreinigung an Sephadex G 100		
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Antennen-drüse	12200	17100			39	51	1 : 1,41		1 : 1,87	
	6850	10200			38	71	1 : 1,49		1 : 2,76	
			3440	5649	302	551		1 : 1,64	1 : 1,82	
Herz	4690	7280			34	29	1 : 1,55		1 : 1,34	
Enddarm	4690	6846			40	35	1 : 1,43		1 : 1,24	

Tab. 14: Vergleich der Gesamtaktivitäten gegenüber Glucose und Mannose vor und nach der Chromatographie an DEAE-Celulose.

a = Glucose
b = Mannose

Die Gesamtaktivität nach der Chromatographie gegenüber Mannose stellt die Summe der Aktivitäten in Fraktion I und II dar.

Herzen keine statistische Sicherung ergibt, dürfte auf die Unübersichtlichkeit der Versuchsbedingungen an Rohextrakten und die unterschiedliche Stabilität der beiden Enzyme zurückzuführen sein.

Nach den Versuchen der Gelfiltration an Sephadex G 100 und G 200 dürfte das Molekulargewicht beider Hexokinasen bei 100 000 liegen. Dies entspräche etwa der Hefehexokinase (Molekulargewicht 96 000). Die wenigen, an Rohextrakt durchgeführten Untersuchungen gestatten aber keine genauere Aussage.

Zur vollständigen Charakterisierung der beiden Hexokinasen könnte man noch Untersuchungen über das Hemmverhalten der beiden Enzyme anstellen.

Welche Bedeutung das als Fraktion I bezeichnete spezifische Enzym im Stoffwechsel des Flußkrebses einnimmt, läßt sich nicht sagen. Spezifische Manno-kinasen wurden bei Echinococcus granulosus (AGOSIN u. ARAVENA 1959) und Schistosoma mansoni (BUEDING u.a. 1954, 1955) isoliert. Einen Hinweis für das Vorliegen eines besonderen Enzyms für die Phosphorylierung der Mannose fanden PALLERONI u. Mitarb. (1956) in Extrakten von Pseudomonas saccharophila. Ob der hohe Mannoseumsatz durch das Enzym des Flußkrebses in vivo überhaupt eine Rolle spielt, wird sich erst entscheiden lassen, wenn Näheres über den Kohlehydratstoffwechsel des Versuchstieres bekannt ist.

Z u s a m m e n f a s s u n g

1. Es wurde untersucht, ob die Hexokinaseaktivität in den Organen des Flußkrebsses Orconectes limosus (RAPINESQUE) auf dem Vorhandensein mehrerer Enzyme beruht. Ferner wurden einige Eigenschaften der Hexokinase ermittelt.
2. Als Enzymquelle wurden die drei Organe mit der höchsten Hexokinaseaktivität verwendet: Antennen-drüse, Enddarm, Herz.
3. Versuche am Rohextrakt führten zu folgenden Ergebnissen:

Die Hexokinaseaktivität ist nicht partikelgebunden. Zwischen den Geschlechtern bestehen keine signifikanten Unterschiede in der Aktivität gegenüber Glucose und Mannose.

Die maximale Aktivität wird bei einem pH-Wert über 7,7 erhalten. Zwischen pH 7,7 und pH 9,0 war kein Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität festzustellen.

Durch hohe Salzkonzentrationen und pH-Werte unter 6 bzw. über 8 wird die Aktivität teilweise zerstört.

Die Inaktivierung bei Lagerung erfolgt nicht immer gleich rasch.

Die Ergebnisse der Spezifitätsuntersuchung mit 6 Zuckern an den drei Rohhomogenaten gestatten keinen Schluß auf das Vorliegen verschiedener Hexo-kinasen. Mannose wird am schnellsten phosphoryliert.
4. Die Reinigung des Rohextraktes durch Ammoniumsulfat-Fällung scheiterte an der Inaktivierung der Enzyme.
5. Durch Chromatographie des Rohextraktes an DEAE-Cellulose wurden übereinstimmend aus allen drei Organen zwei Hexokinaseaktivitäten unterschiedlicher Spezifität isoliert. Die beiden Fraktionen sind chromatographisch einheitlich. Das eine Enzym wurde im Vorlauf erhalten (Fraktion I), das andere

im NaCl-Gradienten (Fraktion II). Elektrophorese an Polyacrylamidgel brachte keinen Hinweis auf das Vorliegen mehrerer Enzyme in Fraktion II.

6. Die Enzyme haben folgende Eigenschaften:

Von 10 Zuckern setzt Fraktion I nur Mannose und Fructose um; die Phosphorylierung der Fructose beträgt nur 20% des Umsatzes der Mannose. Fraktion II phosphoryliert 6 der 10 Zucker und zwar Glucose, Mannose, 2-Desoxyglucose, Fructose, Glucosamin und Galaktosamin, nicht aber Galaktose, N-Acetylglucosamin, Fucose und Ribose.

Endprodukte der Phosphorylierung sind bei beiden Enzymen für alle Substrate Zucker-6-Phosphate.

Die Michaeliskonstanten der Fraktion I für Mannose und Fructose sind $3,9 \cdot 10^{-5}$ M und $2,9 \cdot 10^{-3}$ M, die der Fraktion II für Glucose, Mannose und Fructose $7,1 \cdot 10^{-5}$ M, $8,0 \cdot 10^{-5}$ M und $6,7 \cdot 10^{-3}$ M.

7. Die Fraktion I kann man als spezifische Hexokinase für Mannose auffassen, die Fraktion II entspricht in ihrer Substratspezifität einer unspezifischen Hexokinase.

Literaturverzeichnis

Die mit + gekennzeichneten Arbeiten wurden nur im Referat gelesen.

- AGOSIN, M. and L. ARAVENA (1959) : Studies on the metabolism of Echinococcus granulosus.
Biochim. biophys. Acta 34, 90-102
- AGRANOFF, B.W. and R.O. BRADY (1956) : Purification and properties of calf liver ribokinase.
J. biol. Chem. 219, 221-229
- AGREN, G., L. ENGSTRÖM and S. EKLUND (1960) : Purification of yeast hexokinase by cellulose ion exchanger chromatography.
Acta chem. Scand. 14, 1844
- AGREN, G., L. ENGSTRÖM and S. EKLUND (1963) : Chromatographic purification of yeast hexokinase.
Biochim. biophys. Acta 67, 143-145
- ALVARADO, F. (1960) : Substrate specificity of Saccharomyces fragilis galactokinase
Biochim. biophys. Acta 41, 233-238
- +ASENSIO, C. (1960) : Glucokinasa y N-acetilglucosaminokinasa en Escherichia coli.
Rev. Espanala Fisiol. 16, 121-128
- ASHWELL, G. (1957) : Colorimetric analysis of sugars. In: S.P. COLOWICK and N.O. KAPLAN: Methods in Enzymology Vol. 3, 73-105; New York: Academic Press
- BAILY, K. and E.C. WEBB (1948) : Purification of yeast hexokinase and its reaction with $\beta\beta'$ -dichlor-diäthylsulfid.
Biochem. J. 42, 60-68
- BELITZ, H.J. (1960) : Die Anwendung statistischer Methoden in der Biologie.
Mathematikunterricht 3, 83-103
- BERGER, J., M.W. SLEIN, S.P. COLOWICK and C.F. CORI (1946) : Isolation of yeast hexokinase.
J. gen. Physiol. 29, 379-391
- BERGMAYER, H.U. (1962) : Methoden der enzymatischen Analyse. S. 156
Weinheim: Verlag Chemie
- BLECHER, M. (1963) : Intracellular localization of glucokinase and glycolytic enzymes in lymphosarcoma.
J. biol. Chem. 238, 513-516
- BRINTZINGER, H., S. FALLAB und H. ERLÉNMEYER (1959) : Zur Metallspezifität der Hexokinase.
Experientia 15, 96-97
- BUEDING, E., H. RUPPENDER and J. MACKINNON (1954) : Glucosamin kinase of Schistosoma mansoni.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 40, 773-777

- BUEDING, E. and J. MACKINNON (1955) : Hexokinases of Schistosoma mansoni.
J. biol. Chem. 215, 495-505
- BURMA, D.P. and B.L. HORECKER (1957) : L-Ribulokinase and the formation of D-xylulose-phosphate in Lactobacillus pentosus.
Biochim. biophys. Acta 24, 660-661
- BURMA, D.P. and B.L. HORECKER (1958) : Pentose fermentation by Lactobacillus plantarum. III. Ribulokinase.
J. biol. Chem. 231, 1039-1051
- CADENAS, E. and A. SOLS (1960) : The ketokinase activity of the intestinal mucosa.
Biochim. biophys. Acta 42, 490-498
- CARDINI, C.E. and L.F. LEOIR (1953) : Enzymic phosphorylation of galaktosamin and galaktose.
Arch. Biochem. Biophys. 45, 55-64
- CHATTERJEE, A.N., J.C. RAY and J.J. GROSH (1958) : Hexokinase activity in cell-free extracts of Leishmania donovani.
Nature 182, 109-110
- CORI, G., S. OCHOA, M. SLEIN and C.F. CORI (1951) : The metabolism of fructose in liver. Isolation of fructose-1-phosphate and inorganic pyrophosphate.
Biochim. biophys. Acta 2, 304-317
- COWGILL, R.W. and A.B. PARDEE (1957) : Experiments in biochemical research techniques. S.176
New York: John Wiley & Sons
- CRANE, R.K. and A. SOLS (1953) : The association of hexokinase with particulate fractions of brain and other tissue homogenates.
J. biol. Chem. 203, 273-292
- CRANE, R.K. and A. SOLS (1955) : Animal tissue hexokinase.
In: S.P. COLOWICK and N.O. KAPLAN: Methods in Enzymology Vol. 1, 277-286; New York: Academic Press
- CRANE, R.K. (1962) : Hexokinases and pentokinases.
In: P.D. BOYER, H. LARDY and K. MYRBÄCK: The Enzymes 2nd.ed. Vol. 6, 47-66; New York: Academic Press.
- DAVIDSON, E.A. (1960) : Hexokinase from Aspergillus parasiticus.
J. biol. Chem. 235, 23-25
- DAVIS, B.J. (1964) : Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404-427
- DIPIETRO, D.L. and S. WEINHOUSE (1960) : Hepatic glucokinase in the fed, fasted and alloxan-diabetic rat.
J. biol. Chem. 235, 2542-2545

- DIPIETRO, D.L., C.SHARMA and S.WEINHOUSE (1962) :
Studies on glucose phosphorylation in rat liver.
Biochemistry 1, 455-462
- DIPIETRO, D.L. (1963) : Hexokinase of white adipose
tissue.
Biochim. biophys. Acta 67, 305-312
- V.EULER, H. und E.ADLER (1935) : Über die Komponenten
der Dehydrasesysteme. VI. Dehydrierung von Hexo-
sen unter Mitwirkung von Adenosintriphosphor-
säure.
Z. physiol. Chem. 235, 122-153
- GANDER, J.E. and W.LEPKOWSKI (1962) : On the mechanism
of action of galaktokinase isolated from Saccha-
romyces fragilis.
Fed. Proc. 21, 243
- GINSBURG, V. and H.G.HERS (1960) : On the conversion
of fructose to glucose by guinea pig intestine.
Biochim. biophys. Acta 38, 427-434
- +GROMOVA, K.G. (1963) : Fructokinase in the adipose
tissue of rat epididymus (Russ.).
Dokl. Akad. Nauk. SSSR 153, 1207-1209
- HEINRICH, M.R. (1964) : The purification and properties
of yeast galaktokinase.
J. biol. Chem. 239, 50-53
- HERNÁNDEZ, A. and A.SOLS (1963) : Transport and phos-
phorylation of sugars in adipose tissue.
Biochem. J. 86, 166-172
- HERS, H.G. (1952) : La fructokinase du foie.
Biochim. biophys. Acta 8, 416-423
- HERS, H.G. (1952) : Rôle du magnésium et du potassium
dans la réaction fructokinase.
Biochim. biophys. Acta 8, 424-430
- HERS, H.G. (1955) : Fructokinase (Ketohehexokinase).
In: S.P.COLOWICK and N.O.KAPLAN: *Methods in*
Enzymology Vol. 1, 286-290; New York: Academic
Press.
- HETTLER, H. (1959) : Paper chromatography of inorganic
phosphorus compounds.
In: *Chromat. rev.* 1, 225-245
- HICKMAN, J. and G.ASHWELL (1958) : Purification and
properties of D-Xylulokinase in liver.
J. biol. Chem. 232, 737-748
- HINSBERG, K. und K.LANG (1957) : *Medizinische Chemie*.
3.Aufl., München: Urban & Schwarzenberg
- HOARE, D.S. and M.KERLY (1954) : Phosphorylation of
carbohydrates in retinal extracts.
Biochem. J. 58, 38-44
- HOCHSTER, R.M. and R.W.WATSON (1952) : Phosphorylation
of xylose by extracts of Pseudomonas hydrophila.
Nature 170, 357-358

- HOCHSTER, R.M. (1954-55) : The formation of phosphorylated sugars from D-xylose by extracts of Pseudomonas hydrophila.
Canad. J. Microbiol. 1, 346-363
- ILYIN, V.S. (1964) : Hormonal regulation of liver hexokinase activity.
In: G.WEBER: Advances in Enzyme Regulation Vol. 2, 151-175; Oxford-London-Edinburgh-New York-Paris-Frankfurt: Pergamon Press
- ⁺JAGANNATHAN, V. (1963) : Solubilization and purification of brain hexokinase.
Indian. J. Chem. 1, 192-193
- JOHNSON, M.K. (1960) : The intracellular distribution of glycolytic and other enzymes in rat-brain-homogenates and mitochondrial preparations.
Biochem. J. 77, 610-618
- JOVIN, T., A.CHRAMBACH and M.A.NAUGHTON (1964) : An apparatus for preparativ temperature regulated polyacrylamide gel electrophoresis.
Anal. Biochem. 9, 351-369
- KELLER, R. (1965) : Die Aktivitäten von Enzymen der Glykolyse und des Citronensäurezyklus in den Organen von Cambarus affinis SAY (Crustacea, Dekapoda).
Z. vergl. Physiol. 50, 119-136
- KERLY, M. and D.H.LEABACK (1957) : Characteristics of hexokinase from Locusta migratoria muscle.
Biochem. J. 67, 245-250
- KERLY, M. and D.H.LEABACK (1957) : Hexokinase-specificity in brain from various species.
Biochem. J. 67, 250-252
- KLINE, E.S. and L.S.BARON (1957) : Xylose metabolism in genetic variants of Salmonella typhosa.
Arch. biochem. biophys. 66, 128-139
- KRAHL, M.F., A.K.KELTCH, C.P.WALTERS and G.H.GLOWES (1954) : Hexokinase-activity from eggs of the sea-urchin Arbacia punctulata.
J. gen. Physiol. 38, 31-39
- KUNITZ, M. and M.R.MCDONALD (1946) : Crystalline hexokinase.
J. gen. Physiol. 29, 393-412
- LANGE, C.F. and P.KOHN (1961) : Substrate specificity of hexokinases.
J. biol. Chem. 236, 1-5
- LELOIR, L.F., C.E.CARDINI and J.M.OLAVARRIA (1958) : Phosphorylation of acetylhexosamines.
Arch. biochem. biophys. 74, 84-91
- LIMA, I.H., M.A.SMITH and M.A.STAHMANN (1965) : a comparison of the resolving power of acrylamide gel electrophoresis and CM-chromatography for polylysine.
Anal. biochem. 10, 318-324

- LINDER, A. (1959) : Planen und Auswerten von Versuchen
2. Aufl.; Basel-Stuttgart: Birkhäuser
- LONG, C. (1955) : Studies involving phosphorylation.
4. The conversion of D-ribose into D-ribose-5-phosphate by extracts of Escherichia coli.
Biochem. J. 59, 322-329
- MANJESHWAR, R., C. SHARMA, H. P. MORRIS, A. J. DONNELLY and S. WEINHOUSE (1965) : Glucose-ATP-Phosphotransferases during hepatocarcinogenesis.
In: G. WEBER: Advances in Enzyme Regulation
Vol. 3, 317-324; Oxford-London-Edinburgh-New York-Paris-Frankfurt: Pergamon Press
- *MARTINEZ, R. J. (1961) : Specificity of the phosphate donor in the hexokinase reaction.
Arch. Biochem. 93, 508-513
- MATTENHEIMER, H. (1961) : Mikromethoden für das klinisch-chemische und biochemische Laboratorium
S. 51-55. Berlin: de Gruyter & Co.
- MAYER, S. E. and A. C. MAYFIELD (1963) : Subcellular distribution of hexokinase in mammalian heart.
Fed. Proc. 22, 656
- MCCOMB, R. B. and W. D. YUSHOK (1959) : Properties of particulate hexokinase of the Krebs-2-Ascites Tumor.
Biochim. biophys. Acta 34, 515-526
- MCDONALD, M. R. (1955) : Yeast hexokinase.
In: S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN: Methods in Enzymology Vol. 1, 269-276; New York: Academic Press
- MEDINA, A. and A. SOLS (1956) : A specific fructokinase in peas.
Biochim. biophys. Acta 19, 378-379
- MEDINA, A. and D. J. D. NICHOLAS (1957) : Some properties of a zinc-dependent hexokinase from Neurospora crassa.
Biochem. J. 66, 573-578
- MEYERHOF, O. (1927) : Über die enzymatische Milchsäurebildung im Muskelextrakt. III. Die Milchsäurebildung aus den gärfähigen Hexosen.
Biochem. Z. 183, 176-215
- MEYERHOF, O. (1932) : Über die Abtrennung des milchsäurebildenden Ferments aus Erythrocyten.
Biochem. Z. 246, 249-284
- MEYERHOF, O. (1935) : Über die Wirkungsweise der Hexokinase.
Naturwiss. 23, 850-851
- MOORE, C. L. and H. J. STRECKER (1963) : Solubilization and purification of brain hexokinase.
Fed. Proc. 22, 411
- NETTER, H. (1959) : Theoretische Biochemie.
Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer

- NIEMEYER, H., L. CLARK-TURRI, E. GARCÉS and F. E. VERGARA (1962) : Selective response of liver enzymes to the administration of different diets after fasting.
Arch. Biochem. Biophys. 98, 77-85
- NIEMEYER, H., L. CLARK-TURRI and E. RABAJILLE (1963) : Induction of glucokinase by glucose in rat liver.
Nature 198, 1096-1097
- ORNSTEIN, L. (1964) : Disc electrophoresis. I. Background and theory.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 321-349
- PALLERONI, N. J., R. CONTOPOULOU and M. DOUDOROFF (1956) : Metabolism of carbohydrates by Pseudomonas saccharophila. II. Nature of the kinase reaction involving fructose.
J. Bacteriol. 71, 202-207
- PARKS, R. E., E. BEN-GERSHOM and H. A. LARDY (1957) : Liver fructokinase.
J. biol. Chem. 227, 231-242
- PLOETZ, T. (1955) : Kohlenhydrate.
In: HOPPE-SEYLER-THIERFELDER: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse Bd. III/1, 646-783. 10. Aufl.
Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer
- PROSSER, C. L. and F. A. BROWN (1961) : Comparative animal physiology. 2nd. ed. p. 75
Philadelphia-London: Saunders.
- RAYMOND, S. and Y. J. WANG (1960) : Preparation and properties of acrylamide gel for use in electrophoresis.
Anal. Biochem. 1, 391-396
- REGEN, D. M., W. W. DAVIS, H. E. MORGAN and C. R. PARKS (1964) : The regulation of hexokinase and phosphofructokinase in heart-muscle.
J. biol. Chem. 239, 43-49
- ROSE, I. A. and E. L. O'CONNELL (1964) : The role of glucose-6-phosphate in the regulation of glucose metabolism in human erythrocytes.
J. biol. Chem. 239, 12-17
- RUIZ-AMIL, M. (1962) : The hexokinase of the honey bee.
J. Insect. Physiol. 8, 259-265
- SABLE, H. Z. (1955) : Yeast pentokinase.
In: S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN: Methods in Enzymology Vol. 1, 357-360; New York: Academic Press
- SABLE, H. Z. (1952) : Pentose metabolism in extracts of yeast and mammalian tissue.
Biochim. biophys. Acta 8, 687-697

- SALAS, J., M. SALAS, E. VINUELA and A. SOLS (1965) :
Glucokinase of rabbit liver. Purification and
properties.
J. biol. Chem. 240, 1014-1018
- SALTMAN, P. (1953) : Hexokinase in higher plants.
J. biol. Chem. 200, 145-154
- SEED, J. R. and M. A. BAQUERA (1965) : The characteri-
zation of hexokinase from Trypanosoma rhode-
siense and Trypanosoma gambiense.
J. Protozool. 12, 427-432
- SHARMA, C., R. MANJESHWAR and S. WEINHOUSE (1964) :
Hormonal and dietary regulation of hepatic
glucokinase.
In: G. WEBER: Advances in Enzyme Regulation
Vol. 2, 189-200; Oxford-London-Edinburgh-New
York-Paris-Frankfurt: Pergamon Press
- *SHEMANOVA, G. F. and V. A. BLAGOVESCHENSKY (1956) :
Hexokinase of Clostridium oedematiens and some
of its properties (Russ.).
Biochimija 21, 356-358
- SIMPSON, F. J. and W. A. WOOD (1956) : L-ribulose-5-
phosphate: Formation by purified kinase from
Aerobacter aerogenes.
J. Am. Chem. Soc. 78, 5452-5453
- SIMPSON, F. J. and W. A. WOOD (1958) : Degradation of
L-arabinose by Aerobacter aerogenes. II. Puri-
fication and properties of L-Ribulokinase.
J. biol. Chem. 230, 473-486
- SLEIN, M. W., G. T. CORI and C. F. CORI (1950) : a com-
parative study of hexokinase from yeast and
animal tissues.
J. biol. Chem. 186, 763-780
- SMITH, P. J. C. (1960) : Carbohydrate metabolism in
Spirochaeta recurrentis. IV. Some properties
of hexokinase and lactic dehydrogenase in
Spirochaetes.
Biochem. J. 76, 514-520
- SOLS, A. and R. K. CRANE (1954) : Substrate specificity
of brain hexokinase.
J. biol. Chem. 210, 581-595
- SOLS, A. (1956) : Hexokinase-activity of the intesti-
nal mucosa.
Biochim. biophys. Acta 19, 144-152
- SOLS, A., G. FUENTE, C. VILLAR-PALASI and C. ASENSIO
(1958) : Substrate specificity and some other
properties of baker's yeast hexokinase.
Biochim. biophys. Acta 30, 92-101
- SOLS, A., E. CADENAS and F. ALVARADO (1960) : Enzymatic
basis of mannose toxicity in honey bees.
Science 131, 297-298

- SOLS, A. M. SALAS and E. VINUELA (1964) : Induced biosynthesis of liver glucokinase.
In: G. WEBER: Advances in Enzyme Regulation
Vol. 2, 177-188; Oxford-London-Edinburgh-
New York-Paris-Frankfurt: Pergamon Press
- SOMOGYI, M. (1945) : Determination of blood sugar.
J. biol. Chem. 160, 69-73
- STAHL, E. (1962) : Dünnschicht-Chromatographie. S. 498
Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer
- STUMPF, P. K. and B. L. HORECKER (1956) : The role of
xylulose-5-phosphate in xylose metabolism of
Lactobacillus pentosus.
J. biol. Chem. 218, 753-768
- ⁺SYDOW, G. (1963) : Über den Hexokinasegehalt einiger
Zellfraktionen verschiedener Normal- und Tumorgewebe.
Acta Biol. Med. Germ. 10, 590-601
- ⁺SZYMONA, M., O. SZYMONA and S. KULESZA (1962) : On the
occurrence of inorganic polyphosphate hexokinase
in some microorganisms.
Acta microbiol. pol. 11, 287-300
- ⁺SZYMONA, M. (1962) : Purification and properties of
the new hexokinase utilizing inorganic polyphosphate.
Acta biochim. pol. 9, 165-181
- SZYMONA, M. and W. OSTROWSKI (1964) : Inorganic polyphosphate glucokinase of Mycobacterium phlei.
Biochim. biophys. Acta 85, 283-295
- THIELMANN, K. und E. BLUME (1962) : Intracelluläre
Verteilung von Hexokinase und ATP in der Leber
alloxandiabetischer Mäuse.
Hoppe-Seylers Z. 328, 164-173
- TIEDEMANN, H. und J. BORN (1959) : Versuche zum Mechanismus der Pasteur-Reaktion. Der Einfluß von
Phosphationen auf die Aktivität der strukturgebundenen Hexokinase.
Z. Naturforsch. 14b, 477-478
- TRAYSER, K. and S. P. COLOWICK (1961) : Properties of
crystalline hexokinase from yeast. IV. Multiple
forms of enzyme.
Arch. Biochem. Biophys. 94, 177-181
- URICH, K. (1961) : Mitteldarmdrüsen und Insektenfettkörper als Zentralorgane des Stoffwechsels.
Erg. Biol. 24, 156-190
- URICH, K. (1964) : Die räumliche Ordnung der Stoffwechselprozesse im Metazoenorganismus.
Helgoländer wiss. Meeresunters. 9, 150-157
- VAUGHAN, D. A., J. P. HANNON and L. N. VAUGHAN (1960) :
Effects of diets on selected glycolytic enzymes of the rat.
Amer. J. Physiol. 199, 1041-1044

- VESTLING, C.S., A.K. MYLROIE, U. IRISH and N.H. GRANT (1950) : Rat liver fructokinase. J. biol. Chem. 185, 789-801
- VINUELA, E., M. SALAS and A. SOLS (1963) : Glucokinase and hexokinase in liver in relation to glycogen synthesis. J. biol. Chem. 238, PC 1175-1177
- WALAAS, E. and O. WALAAS (1962) : The activation of muscle hexokinase by divalent metal ions. Acta chem. Scand. 16, 1682-1694
- WALKER, D.G. (1962) : The development of hepatic hexokinases after birth. Biochem. J. 84, 118P-119P
- WALKER, D.G. (1963) : On the presence of two soluble glucose-phosphorylating enzymes in adult liver and the development of one of these after birth. Biochim. biophys. Acta 77, 209-226
- WALKER, D.G. (1963a) : The postnatal development of hepatic fructokinase. Biochem. J. 87, 576-581
- WALKER, D.G. (1965) : Development of hepatic enzymes for the phosphorylation of glucose and fructose. In: G. WEBER: Advances in Enzyme Regulation Vol. 3, 163-184; Oxford-London-Edinburgh-New York-Paris-Frankfurt: Pergamon Press
- WEINHOUSE, S., V. CRISTOFALO, C. SHARMA and H.P. MORRIS (1963) : Some properties of glucokinase in normal and neoplastic liver. In: G. WEBER: Advances in Enzyme Regulation Vol. 1, 363-371; Oxford-London-Edinburgh-New York-Paris-Frankfurt: Pergamon Press
- WIEME, R. and M. RABAY (1957) : A new technique of quantitative ultra-microelectrophoresis. Naturwiss. 44, 112-113
- ⁺ZEWE, V., H.J. FROMM and R. FABIANO (1964) : The effect of manganous ion on the kinetics and mechanism of the yeast hexokinase reaction.

Lebenslauf

Am 19. Februar 1939 wurde ich als Tochter des Hüt-tendirektors Dr. Walter Cordes und seiner Ehefrau Hedwig, geb. Schmiele in Düsseldorf geboren. Die Grundschule besuchte ich von 1946-1950 in Eichen bei Siegen und in Mönchengladbach. Im Frühjahr 1950 wurde ich in die Staatliche Studienanstalt, Lyzeum und Frauenoberschule in Mönchengladbach eingeschult. Im Oktober 1952 verzogen wir nach Dinslaken (Nieder-rhein). Dort besuchte ich das Neusprachliche Mäd-chengymnasium, an dem ich im Frühjahr 1959 die Rei-feprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1959 begann ich mit dem Studium der Zoologie an der Freien Universität Berlin, wo ich bis zum Ende des Wintersemesters 1965/66 imma-trikuliert war. Meine akademischen Lehrer in Zoolo-gie waren die Herren Professoren Günther, Herter, Kemper, Peus, Ulrich und Urich. Botanik hörte ich bei den Herren Professoren Drawert, Eckhardt und Reinert, Genetik und Allgemeine Biologie bei Herrn Professor Lüers, Chemie bei den Herren Professoren Jahr, Lautsch und Vetter, Physik bei Herrn Professor Lassen und Mathematik bei Herrn Professor Ueberrei-ter. Im Februar 1962 bestand ich die Diplom-Vorprü-fung in Biologie. Im Herbst 1963 begann ich am II. Zoologischen Institut unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. K. Urich mit den Versuchen zu der vor-liegenden Dissertation.

Am 19. März 1965 wurde ich mit dem Diplomingenieur Armin Wolter getraut.

Foto - Druck
Chemoprint^{OHG}
Gießen